

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos

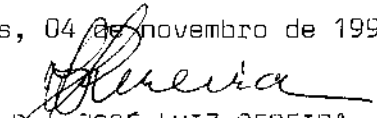
**ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVOS
PAUCIPRODUTORES DE ENTEROTOXINAS
E RELATO DE UM SURTO POR ESPÉCIE COAGULASE POSITIVA**

MARIA LÚCIA PEREIRA
Farmacêutica-Bioquímica

PROFESSOR Dr. JOSÉ LUIZ PEREIRA
Orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por MARIA LÚCIA PEREIRA e aprovada pela Comissão Julgadora em 04.11.96
Campinas, 04 de novembro de 1996


Prof. Dr. JOSÉ LUIZ PEREIRA

Presidente da Banca

**Esta tese é apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP,
para obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos**

Campinas, Estado de São Paulo, Brasil, 1996



P414e

Pereira, Maria Lúcia

Estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas e relato de um surto por espécie coagulase positiva. / Maria Lúcia Pereira. -Campinas, SP: (s.n.), 1996.

Orientador: José Luiz Pereira

Tese (doutorado)-Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

I. Alimentos-microbiologia. I. Pereira, José Luiz
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III. Título.

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	T/UNICAMP
	P414e
V.	E ₁
TOMBO BC	29289
PROC.	667196
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/12/96
N.º CPD	

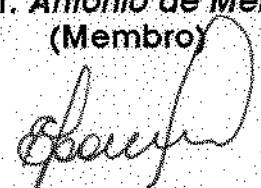
CM-00095400-2

BANCA EXAMINADORA

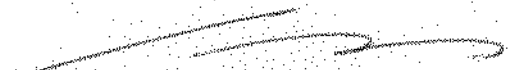


Professor Dr. José Luiz Pereira
(Orientador / Presidente)

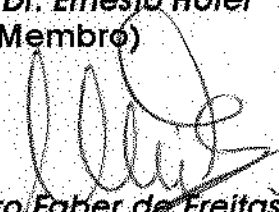
Professor Dr. António de Melo Serrano
(Membro)



Professor Dr. Edir Nepomuceno da Silva
(Membro)



Professor Dr. Ernesto Hofer
(Membro)



Professor Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
(Membro)

Professora Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer
(Membro)



Professora Dra. Sirdéia Maura Perrone Furlanetto
(Membro)

Campinas, de de 1996.

Em Baependi, sul de Minas, existe uma Santa, que nem Santa ainda o é.
Participa, todavia, da miséria, servidão e penas de muitos.
E, poderosa, os conecta de maneira simples e ágil
a um tempo de tranquilidade, prazer e fartura.
Nhá Chica, meu reconhecimento. Meu coração aberto.

Ao Professor Dr. *Carlos Ribeiro Diniz*, elo de emoção e ciência,
que nos ata, pesquisadores, à Fundação Ezequiel Dias.

Silenciosamente, aos meus pais,
Elpidio Custódio Pereira e Aguilmar de Souza Andrade
e meu irmão *Argemiro de Souza Andrade Neto*.
Vivência plena. Lavra de saudade benfazeja.

Aos outros irmãos, *Luzia Magali, João Expedito, Maria Zélia e José Ernani*.
Personagens da mesma história.

Para *Antônio Augusto Lins Mesquita*
pelo tempo de família - alquimia e poesia.

Para *Carollna Pereira Lins Mesquita, Pedro Lins Mesquita* e *João* (anjo alado).
Mágicos inventores da renovação dos sonhos.

Para Dorasilvia Pontes Lima.
"A amizade é o outro nome da palavra amor"

Ao Professor Dr. *José Luiz Pereira*, da FEA, UNICAMP,
minha gratidão pela orientação inteligente, honesta, leve e profícua.

To Dr. *Merlin S. Bergdoll*, Emeritus Professor of the University of Wisconsin, U.S.,
for his wisdom and availability in transmitting knowledge, confidence and experience
throughout the period of this research.
I am deeply grateful to him.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Carlos Ribeiro Diniz, Diretor do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento (DCPD), Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela bolsa concedida através do Programa RHA-E-Biotecnologia 257/88, processo individual nº 160257/92-1.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), na pessoa de seu Diretor Científico, Dr. Afrânio Carvalho de Aguiar, pelo financiamento do projeto CBS-1129/93.

À FUNED, nas pessoas de seu Superintendente, Sr. Roberto Porto Fonseca, ao Diretor e Ex-Diretor do Instituto Otávio Magalhães (IOM), Sr. Nery Cunha Vital e Sr. Márcio Antônio Moreira Galvão, à Diretora Administrativa e Financeira, Sra. Helena Maria Gazzinelli Cruz Oliveira (DAF) e à Coordenadora da Divisão de Bromatologia e Toxicologia (DBT), IOM, Sra. Elizabeth Corrêa Catalan Pereira, pelo fornecimento de estrutura laboratorial, apoio e liberação oficial de minhas atividades profissionais.

À Sra. Ada Mandil, Ex-Chefe do Serviço de Microbiologia, DBT, IOM, FUNED, por ter sempre creditado em mim "a certeza do ir".

À Valée Diagnóstica, através da Sra. Ana Maria de Paula, Gerente Técnico-Linha Diagnóstica, pelos "kits SET-RPLA", TD 900, Oxoid e à Biobrás, Bioquímica do Brasil S/A, na pessoa de seu Gerente Nacional de Vendas, Sr. Máximo Gorki Dolabella Bicalho, pelos meios de cultivo, material este generosamente concedido a esta pesquisa.

À Sra. Maria Sílvia de Almeida Milagre e Sra. Ana Maria Gosling Fausto, Ex-Secretárias do IOM e DCPD, FUNED, ao Sr. Ricardo Souza Cruz Neto, Ex-Coordenador da Divisão de Recursos Humanos (DRH), DAF, FUNED, e à Sra. Esther Margarida Alves Ferreira Bastos, Chefe do Serviço de Microscopia, DBT, IOM, FUNED, pela solidariedade em momento politicamente desconfortável.

Ao Sr. Luiz Simeão do Carmo, pela delicadeza do convite para o desenvolvimento deste trabalho no Laboratório de *Staphylococcus*, Serviço de Microbiologia, DBT, IOM, FUNED, sob sua direção.

À Sra. Elisângela José dos Santos, bolsista de aperfeiçoamento científico do projeto CAG-374/90 (FAPEMIG), Laboratório de *Staphylococcus*, Serviço de Microbiologia, DBT, IOM, FUNED, pelo carinho e interesse em ajudar.

Ao Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine, Chefe do Serviço de Pesquisa, DCPD, FUNED, pelas sugestões concernentes ao controle de reações inespecíficas no "RPLA".

Aos Serviços de Microbiologia, Microscopia, Química Bromatológica e Química Especializada, DBT, IOM, FUNED, através de seus funcionários e nas pessoas de seus Chefes, respectivamente, Sra. Maria Berenice Cardoso Martins Vieira, Sra. Esther Margarida Alves Ferreira Bastos, Sra. Marlen Rodrigues Ribeiro e Sr. Guilherme Prado pelo suprimento, em alguns momentos, de material de consumo, equipamentos e área física, apoio incontestável à condução deste experimento.

À Sra. Maria das Graças Leal da Fonseca, Ex-Chefe do Setor de Produção de Meio de Cultura, IOM, FUNED, pelo preparo de meios e reagentes, ajuda na consecução dos ensaios bioquímicos, amizade e dedicação verdadeira.

Ao Setor de Lavagem e Esterilização, IOM, FUNED, na pessoa de seu Chefe Sr. José Martins Ferreira e funcionários, em especial, Sr. Paulo Roberto de Oliveira Rodrigues e Sr. Newton Eustáquio Abreu, pela constante atenção na execução de suas tarefas e particular apreço.

À Sra. Shirley Lasmar, do Setor de Produção de Soros, Diretoria de Produção Farmacêutica e Imunobiológicos (DPFI), FUNED, à Sra. Helena Cury, Ex-Chefe da Divisão de Documentação e Informação (DDI), DCPD, FUNED, ao Dr. Evanguedes Kalapothakis e Sra. Ana do Carmo Valentim, do Serviço de Pesquisa, DCPD, FUNED, ao Sr. Geraldo Leocádio Filho, do Serviço de Microbiologia, Divisão de Biologia Médica (DBM), IOM, FUNED, à Sra. Sandra Mara dos Santos, do Setor de Serpentário, DPFI, FUNED, e ao Sr. Sidney do Carmo e Sra. Anamaria Catão Ferreira Heneine, da Assessoria de Comunicação Social (ACS), FUNED, pelo valioso auxílio técnico.

À Professora Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho, do Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Sr. Luís Roberto Martin, aluno de Pós-Graduação do Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), UNICAMP, pelo fornecimento e readaptação de "software" para aplicação tentativa à "Taxonomia Numérica de Estafilococos".

Aos Professores, Dr. Rômulo Cerqueira Leite, do Departamento de Medicina Preventiva e Sra. Mônica Cerqueira Leite, do Departamento de Inspeção Animal, ambos, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e à Sra. Maria Crisolita Cabral Silva, do Serviço de Microbiologia, DBT, IOM, FUNED, pelo fornecimento de soro normal de carneiro e novilho.

À Sra. Gladys de Souza Magalhães, aluna de pós-graduação da Faculdade de Letras (FALE), UFMG, pela tradução de textos para o inglês.

Ao Sr. Sérgio Augusto Lana e Silva, aluno de graduação do Instituto de Ciências Exatas (ICEx), UFMG, pela encadernação dos exemplares.

À Sra. Maria de Lourdes Mohalen, Sra. Andréia Tersariol Couto, Sra. Dorasívia Pontes Lima e Sra. Glória Ramalho Marques pela partilha de moradia, afeto e caloroso convívio, em meu tempo de Campinas.

À Dra. Maria Cecília Figueiredo Toledo, do Departamento de Ciência e ao Dr. Antônio de Melo Serrano, do Departamento de Tecnologia, FEA, UNICAMP, a saber, a professora impar e o mestre da vida inteira.

Aos colegas e professores da FEA, UNICAMP, pela alegria de poder voltar a ser, novamente, durante quatro inesquecíveis anos, estudante em Universidade Modelo do País.

"Os caminhos da ciência serão mais verdadeiros
sempre que a pesquisa, ela própria, conduzir o pesquisador."

Lúcia Serra

"Em pesquisas, é válido o espírito criador de hipóteses,
que liberte do aprisionamento mental da rotina de análises de alimentos."

Professor Dr. *Antônio de Melo Serrano*

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS...	xviii
LISTA DE FIGURAS...	xxi
RESUMO...	xxiii
ABSTRACT...	xxv
1 - INTRODUÇÃO...	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA...	4
2.1 - Estafilococos: histórico, aspectos taxonômicos, ecossistema e substâncias ligadas à virulência...	4
2.2 - Estafilococos em portadores humanos...	11
2.3 - Estafilococos em reservatórios animais...	14
2.4 - Estafilococos pauciprodutores de enterotoxinas...	19
2.5 - Produção de enterotoxinas por estafilococos não produtores de coagulase e surtos humanos...	21
2.6 - Enterotoxinas estafilocócicas...	27
2.6.1 - Características físico-químicas, comportamento imunológico e determinantes genéticos de produção...	28
2.6.2 - Atividades biológicas e mecanismo de ação farmacológica...	30

2.6.3 - Fatores que influenciam a produção de enterotoxinas...	32
2.7 - Métodos analíticos para averiguação e detecção de enterotoxinas...	33
2.7.1 - Bioensaios...	33
2.7.2 - Métodos imunológicos tradicionais...	34
2.7.3 - Métodos imunológicos finos...	36
3 - MATERIAL..	41
3.1 - Linhagens teste...	41
3.2 - Trezentos gramas aproximadamente de queijo "tipo Minas", semi curado, suspeito de causar surto de intoxicação alimentar humana...	41
3.3 - Equipamentos, meios de cultivo laboratorial e reagentes...	44
3.4 - Outros equipamentos, meios de cultivo laboratorial e reagentes de uso geral em laboratório...	45
4 - MÉTODOS...	46
4.1 - Métodos para avaliação das linhagens teste...	46
4.1.1 - Estudo taxonômico das linhagens teste...	46
4.1.2 - Produção de enterotoxinas pelas linhagens teste, em meios de cultivo laboratorial...	48
4.1.2.1 - Método da "membrana sobre ágar"...	48
4.1.2.2 - Método do "saco de diálise"...	49
4.1.3 - Detecção e quantificação de enterotoxinas produzidas pelas linhagens teste, em meios de cultivo laboratorial...	49
4.1.3.1 - Método da sensibilidade ótima em placa ("OSP")...	49
4.1.3.2 - Método de aglutinação passiva reversa em látex ("RPLA" ou "SET-RPLA")...	50

4.1.4 - Comportamento e produção de enterotoxinas pelas linhagens teste usando alimentos...	51
4.1.4.1 - Inoculação experimental das linhagens teste, em alimentos...	52
4.1.4.2 - Contagem das linhagens teste inoculadas, em alimentos, após 24 e 48h de incubação...	52
4.1.4.3 - Detecção de enterotoxinas produzidas pelas linhagens teste, em alimentos...	52
4.2 - Métodos para avaliação do surto de intoxicação alimentar humana...	53
4.2.1 - Contagem de estafilococos no queijo suspeito...	53
4.2.2 - Estudo taxonômico da linhagem isolada a partir do queijo suspeito...	55
4.2.3 - Produção e detecção de enterotoxina pela linhagem isolada do queijo suspeito, em meios de cultivo laboratorial...	55
4.2.4 - Pesquisa direta da enterotoxina pré-formada no queijo suspeito...	55
4.2.5 - Comportamento e produção de enterotoxina, em alimentos experimentalmente inoculados com a linhagem isolada do queijo suspeito...	56
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO...	58
5.1 - Do estudo taxonômico das linhagens teste e linhagem envolvida no surto...	58
5.2 - Da produção e quantificação de enterotoxinas pelas linhagens teste e <i>S.aureus</i> sub-espécie <i>aureus</i> , ref. "FUNED", procedente do surto, em meios de cultivo laboratorial...	72
5.3 - Da inoculação, em alimentos, das linhagens teste e <i>S.aureus</i> sub-espécie <i>aureus</i> , ref. "FUNED", procedente do surto...	87

5.4 - Do histórico à elucidação do surto de intoxicação humana...	93
6 - CONCLUSÕES...	106
6.1 - Quanto à produção e quantificação de enterotoxinas, em meios de cultivo laboratorial...	106
6.2 - Quanto ao comportamento e produção de enterotoxinas, em alimentos...	106
6.3 - Quanto a elucidação do surto...	107
7 - PERSPECTIVA DE NOVAS PESQUISAS....	108
8 - ANEXOS...	109
8.1 - Anexo 1...	109
8.2 - Anexo 2...	110
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS...	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>S.aureus</i> em portadores humanos...	13
Tabela 2 - Estafilococos em amostras de leite, sítios anatômicos e lesões de diferentes tipos de animais...	17
Tabela 3 - Quantidades, tipos de enterotoxinas e linhagens teste usadas na pesquisa...	42
Tabela 4 - Linhagens teste e tipos de enterotoxinas usadas na pesquisa...	43
Tabela 5 - Características morfológicas das linhagens teste usadas na pesquisa...	59
Tabela 6 - Características de crescimento das linhagens teste usadas na pesquisa, em meios específicos...	60
Tabela 7 - Exigências atmosféricas para desenvolvimento e metabolismo das linhagens teste usadas na pesquisa...	61
Tabela 8 - Tolerância das linhagens teste usadas na pesquisa ao NaCl, em diferentes concentrações...	62
Tabela 9 - Crescimento das linhagens teste usadas na pesquisa em diferentes condições de tempo e temperatura...	63
Tabela 10 - Caracterização bioquímica das linhagens teste usadas na pesquisa...	64
Tabela 11 - Utilização anaeróbica de glicose e manitol pelas linhagens teste usadas na pesquisa...	65
Tabela 12 - Utilização aeróbica de monossacarídeos pelas linhagens teste usadas na pesquisa...	66
Tabela 13 - Utilização aeróbica de di e trissacarídeos e açúcares alcoólicos pelas linhagens teste usadas na pesquisa...	67
Tabela 14 - Perfil hemolítico das linhagens teste usadas na pesquisa...	68

Tabela 15 - Resistência à novobiocina e oxacilina das linhagens teste usadas na pesquisa...	69
Tabela 16 - Susceptibilidade à lisostafina pelas linhagens teste usadas na pesquisa...	70
Tabela 17 - Determinação de sensibilidade do método "RPLA" usando enterotoxina padrão de concentração conhecida...	73
Tabela 18 - Determinação de especificidade do método "RPLA" usando enterotoxina padrão conhecida...	73
Tabela 19 - Produção de enterotoxina pelas linhagens teste usadas na pesquisa utilizando o método "membrana sobre ágar"...	79
Tabela 20 - Produção de enterotoxina pelas linhagens teste usadas na pesquisa utilizando o método do "saco de diálise" com 20mL de Na ₂ HPO ₄ 0,01M, em agitador a 180rpm...	80
Tabela 21 - Produção de enterotoxina pelas linhagens teste usadas na pesquisa utilizando o método do "saco de diálise" com 10mL de Na ₂ HPO ₄ 0,01M, em agitador a 180rpm...	81
Tabela 22 - Produção de enterotoxinas pelas linhagens teste usadas na pesquisa utilizando o método do "saco de diálise" com 20mL de Na ₂ HPO ₄ 0,01M, em agitador a 200rpm...	84
Tabela 23 - Concentração de fluidos sobrenadantes de cultura das linhagens teste usadas na pesquisa com PEG15-20000...	85
Tabela 24 - Comparação de dados sobre a quantidade de enterotoxina estafilocócica produzida a partir das linhagens teste usadas nesta pesquisa e os resultados originais de VALLE <i>et al</i> (1990)...	86
Tabela 25 - Produção de enterotoxinas ("SE") em leite integral tipo "longa vida" inoculado com linhagens teste usadas na pesquisa e <i>S.aureus</i> sub-espécie <i>aureus</i> , ref. "FUNED", proveniente do surto...	88

Tabela 26 - Produção de enterotoxinas ("SE") em presunto cozido inoculado com linhagens teste usadas na pesquisa e <i>S.aureus</i> sub-espécie <i>aureus</i> , ref. "FUNED", proveniente do surto...	89
Tabela 27 - pH em leite tipo "longa vida" inoculado com as linhagens teste usadas na pesquisa e <i>S.aureus</i> sub-espécie <i>aureus</i> , ref. "FUNED", proveniente do surto...	90
Tabela 28 - Perfil epidemiológico do surto de intoxicação alimentar humana ocorrido em Belo Horizonte, MG...	95
Tabela 29 - Produção de enterotoxina a partir de extrato concentrado de queijo envolvido no surto e fluido sobrenadante de <i>S.aureus</i> sub-espécie <i>aureus</i> , ref. "FUNED", neste detectada...	101
Tabela 30 - Confirmação da produção de enterotoxina estafilocócica tipo D a partir de extrato concentrado de queijo envolvido no surto e fluido sobrenadante de <i>S.aureus</i> sub-espécie <i>aureus</i> , ref."FUNED", neste detectada...	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estudo taxonômico das linhagens teste usadas na pesquisa...	47
Figura 2	- Procedimentos analíticos para produção e detecção de enterotoxina pelas linhagens teste usadas na pesquisa...	54
Figura 3	- Procedimentos analíticos para elucidação do surto de intoxicação alimentar humana...	57
Figura 4	- Reações inespecíficas para fluidos sobrenadantes de culturas de linhagens teste usadas na pesquisa quando testados por "RPLA", antes de tratamento com 5% de IgG normal e purificada de coelho...	75
Figura 5	- Resultados positivos e negativos para fluidos sobrenadantes de culturas de linhagens teste usadas na pesquisa quando testadas por "RPLA", após tratamento com 5% de IgG normal e purificada de coelho...	76
Figura 6	- Resultado positivo para produção de nuclease (DNase), em ágar DNA inoculado com <i>S.aureus</i> sub- espécie <i>aureus</i> , ref. "FUNED", procedente do surto...	96
Figura 7	- Resultado positivo para produção de termonuclease (TNase), em ágar azul de O-toluidina-DNA inoculado com <i>S.aureus</i> sub-espécie <i>aureus</i> , ref. "FUNED", procedente do surto...	97
Figura 8	- Hemólise em ágar sangue de carneiro inoculado com <i>S.aureus</i> sub-espécie <i>aureus</i> , ref. "FUNED", procedente do surto...	98
Figura 9	- Crescimento de <i>S.aureus</i> sub-espécie <i>aureus</i> , ref. "FUNED", procedente do surto em meio fluido de tioglicolato de sódio...	99
Figura 10	- Comportamento, em ágar "BP", de <i>S.aureus</i> sub-espécie <i>aureus</i> , ref. "FUNED", procedente do surto...	100

Figura 11 - Confirmação de produção de enterotoxina estafilocócica não identificada pelo método de "ELISA, SET-EIA" a partir de fluido sobrenadante de cultura de *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", procedente do surto, após neutralização e não com anti"SED" ...

104

RESUMO

ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVOS PAUCIPRODUTORES DE ENTEROTOXINAS E RELATO DE UM SURTO POR ESPÉCIE COAGULASE POSITIVA

I- Linhagens de estafilococos coagulase negativos e pauciprodutores de enterotoxinas de A a E, com capacidade de síntese variando de 1,4 a 16,8ng/mL oriundas de sítios anatômicos de cabras sadias, procedentes da Espanha, foram estudadas com o intuito de se avaliar comparativamente desenvolvimento e quantidade de enterotoxina estafilocócica ("SE") produzida, em condições de cultivo laboratorial e em alimentos experimentalmente inoculados. Para tal, 14 linhagens teste - *S.caprae*, ref. 163 e 339; *S.chromogenes*, ref.146; *S.cohnii*, ref. 366; *S.epidermidis*, ref. 10; *S.haemolyticus*, ref. 107 e 214; *S.hyicus*, ref. 129; *S.lentus*, ref. 44, *S.sciuri*, ref. 308; *S.xylosus*, ref. 141 e 335 e *S.warneri*, ref. 14 e 224 - foram primeiramente reavaliadas quanto ao seu perfil morfo-tintorial e bioquímico, tentando-se, através dos caracteres fenéticos obtidos, a classificação adansoniana, para confirmação de espécies. A produção de "SE", utilizando-se cinco diferentes meios de cultivo laboratorial, foi conduzida com os métodos de "membrana sobre ágar" e "saco de diálise". Após incubação a 37°C, durante 24 horas, foi procedida a detecção e quantificação de enterotoxinas através do ensaio de "RPLA" ("Reversed passive latex agglutination test"). Já para a pesquisa em alimentos, adotaram-se leite integral tipo "longa vida" e presunto cozido inoculados com cerca de 10^4 UFC de estafilococos/g ou mL de substrato. Estes substratos, mantidos em estufa a 30°C, durante 24 e 48h de incubação, foram, neste período, submetidos à contagem de células estafilocócicas em ágar "BP" e à avaliação de presença de "SE", através do ensaio de "ELISA, SET-EIA" ("Enzyme linked immunosorbent assay") e "RPLA". Os resultados obtidos evidenciaram que os caracteres fenéticos apresentaram-se em número insuficiente para a montagem da matriz classificatória, permitindo, apenas, a confirmação de *S.haemolyticus*, ref.107. Por sua vez, os dados concernentes a produção de "SE", em condições de cultivo laboratorial, maior número de resultados positivos foram obtidos a partir do método "membrana sobre ágar", destacando-se os meios "Nz4" (Digestivo pancreático de caseína, "Nz amine A", "Nz", a 4% acrescido de extrato de levedura, "Yeast extract", "YE", a 1%; de L-arginine a 0,001% e de KH_2PO_4 a 0,1%), "BHI"-2x-0,5 (Infuso de cérebro e coração, "Brain hearth infusion broth", "BHI", concentração dupla; acrescido de "YE" a 0,5%) e "Nz6" ("Nz" a 6% acrescido

de "YE" a 1%), que sobressaíram por melhor desempenho individual. De uma maneira geral, a quantidade de "SE" produzida foi menor que a dos resultados originais fornecidos para as 14 linhagens teste ressaltando-se ainda a ausência de produção de enterotoxina B, "SEB", para *S.warneri*, *S.haemolyticus*, *S.warneri* e *S.cohnii*, ref. 14, 214, 224 e 366 e enterotoxina D, "SED", para *S.caprae*, ref. 163 e 339. Quanto ao desenvolvimento e produção de "SE", em substratos alimentícios pôde-se verificar que as linhagens teste, tanto em leite integral tipo "longa vida" como em presunto cozido, apresentaram desenvolvimento mínimo estipulado em 10^6 e máximo de 10^9 UFC/g ou mL de alimento, decorridas 48h de incubação, não apresentando contudo, em nenhuma ocasião, produção de "SE" que pudesse ter sido detectada através do ensaio de "ELISA, SET-EIA" e também por "RPLA", nos dois períodos de incubação considerados.

II - Havendo ocorrido um surto de intoxicação alimentar humana, em Belo Horizonte, MG, envolvendo sete pessoas de uma família, com sintomas de vômito, diarreia, prostração e dores abdominais, e período médio de incubação de 4h, que conduziam à hipótese do envolvimento de enterotoxina estafilocócica, efetuou-se o estudo de tal episódio. A pesquisa do agente causal e de possível enterotoxina pré-elaborada no alimento envolvido, queijo tipo "Minas", semi-curado, permitiu evidenciar que a linhagem isolada, em população estimada de $2,9 \times 10^8$ UFC de *S.aureus* sub-espécie *aureus* /g, no queijo suspeito, produzia baixas quantidades de enterotoxina, 180ng de enterotoxina H, "SEH"/mL de fluido sobrenadante de cultura.

ABSTRACT

IMPORTANCE OF NANOGRAM QUANTITIES OF COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS AND AN OUTBREAK DESCRIPTION OF A COAGULASE-POSITIVE STRAIN.

1 - The aim of this work was to establish the relationship of the amount of the enterotoxin produced in laboratory medium and the enterotoxin production in foods by fourteen coagulase-negative low-enterotoxin-producing strains. The strains with synthesis capacity ranging from 1.4 to 16.8ng of staphylococcal enterotoxin/mL were obtained from anatomic sites in healthy goats, in Spain. First of all, *S.caprae*, nº 163 e 339; *S.chromogenes*, nº 146; *S.cohnii*, nº 366; *S.epidermidis*, nº 10; *S.haemolyticus*, nº 107 and 214; *S.hyicus*, nº 129; *S.lentus*, nº 44, *S.sciuri*, nº 308; *S.xylosus*, nº 141 and 335 and *S.warneri*, nº 14 and 224 were studied on its fenetic characters in order to confirm the species through the numerical taxonomy. The enterotoxin production was conducted using five different culture media on membrane over agar and sac culture. After 24h at 37°C incubating period, the staphylococcal enterotoxin (SE) was detected and quantified by RPLA (Reversed passive latex agglutination assay). Samples of whole milk and cooked ham were inoculated with 10^4 CFU *Staphylococci*/g or mL. These substrates were kept at 30°C, during 24 and 48 hours and submitted to the count of staphylococcal cells on BP agar and the enterotoxin detection was made by ELISA, SET-EIA (Enzyme linked immunosorbent assay) and RPLA. The results revealed that the fenetic charactes were insufficient to be applied on matrix species, but confirmed *S.haemolyticus*, nº 107. The enterotoxin production in culture media presented the great number of positive results by membrane over agar, and Nz4 medium (Nz Amine A, Nz, at 4% plus yeast extract, YE, at 1%; L-arginine at 0.001% and KH_2PO_4 at 0.1%), BHI-2x-0.5 medium (Brain hearth infusion broth double concentration plus YE at 0.5%) and Nz6 medium (Nz at 6% plus YE at 1%) were classified for its best results. In general, the amount of enterotoxin produced were lower than the original results reported by its spanish strains. *S.warneri*, *S.haemolyticus*, *S.warneri* and *S.cohnii* (nº 14, 214, 224 and 366) and *S.caprae* (163 and 339) did not produced SEB and SED, respectively. Concerning to staphylococcal behavior in whole milk and cooked ham, all strains showed minimun development of 10^6 and maximun of 10^9 CFU/g or mL after 48 hours incubation period and no SE production was observed in these substrates that could be detected by ELISA, SET-EIA and RPLA.

ii - A study was conducted to verify the presence of staphylococcal enterotoxin in semi-cured "Minas" cheese produced in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, after seven members of one family became ill with vomiting, diarrhea, prostration and abdominal pain. This research indicated that the isolated strain, *Staphylococcus aureus* sub-specie *aureus* with a population of $2,9 \times 10^8$ CFU/g, produced a low level of enterotoxin H (SEH), 180 ng/mL, in culture supernatant fluid.

1 - INTRODUÇÃO

O envolvimento de estafilococos, sobretudo *S.aureus*, em surtos de intoxicação ocasionados pela ingestão de suas enterotoxinas previamente elaboradas em alimentos dispõe de ampla divulgação científica.

Vários tipos de alimentos já foram epidemiologicamente incriminados e são freqüentemente relatados como capazes de suportar o desenvolvimento natural e artificial do microrganismo, bem como a produção de suas enterotoxinas. Dentre os principais substratos alimentícios, de acordo com dados oriundos de diferentes países, inclusive do Brasil, podem ser destacados produtos lácteos (queijos, leite cru, pasteurizado e em pó, manteiga e sorvetes), produtos de confeitaria (tortas, bolos recheados e doces cremosos), carnes frescas e curadas; ovos e massas alimentícias.

São conhecidas até o presente momento as toxinas A("SEA"), B("SEB"), C1("SEC"1), C2("SEC"2), C3("SEC"3), D("SED"), E("SEE"), G("SEG"), H("SEH") e "TSTS"-1, esta última isolada de *S.aureus* envolvido na síndrome de choque tóxico, a qual, mesmo não estando relacionada com intoxicação alimentar, apresenta propriedades físico-químicas e imunológicas bastante similares às enterotoxinas.

A detecção das enterotoxinas estafilocócicas foi primeiramente realizada através de métodos biológicos, que consistem na administração da toxina por via intragástrica em macacos e por via intraperitoneal ou intravenosa em gatos. A partir da purificação das enterotoxinas, as técnicas de detecção empregadas fundamentaram-se no uso de anticorpos preparados contra as mesmas, uma vez que as toxinas apresentam-se como proteínas simples não passíveis de detecção por métodos químicos. Reações específicas de precipitação em ágar ou agarose foram utilizadas e paulatinamente desenvolvidas e melhoradas. A técnica de imunodifusão em microlâmina destaca-se como bastante sensível, apresentando sensibilidade que se estende até 0,1µg/mL, em extrato do alimento, e, por sua vez, a metodologia denominada "Sensibilidade Ótima em Placa" ("OSP"), foi considerada exequível e também adequadamente sensível para a avaliação de linhagens enterotoxigênicas, atingindo níveis de detecção próximos a 0,5µg/g de enterotoxina, em fluido sobrenadante de cultura.

Questionamentos a respeito da eficácia e sensibilidade destes métodos passaram contudo a existir quando isolados de *S.aureus* procedentes de alimentos implicados em surtos se apresentaram negativos para a produção de enterotoxinas quando testadas por estes métodos, muito embora se comportassem de forma

positiva no teste de reação emética em macacos. Este fato, foi claramente evidenciado através de informação de que 100 a 200ng/g de "SEA" constituiu dose suficiente para resultar numa intoxicação estafilocócica, em uma escola nos Estados Unidos, onde crianças ingeriram leite achocolatado que continha 0,4-0,7ng/g da enterotoxina detectada pelo método de "ELISA - Enzyme linked Immunosorbent assay" e não puderam ser, portanto, alcançadas pelos métodos tradicionais de imunodifusão como "OSP".

A contaminação de alimentos por estafilococos decorre principalmente de manipuladores sintomáticos ou não, mas também, embora em menor escala, de portadores animais. Trabalhos realizados a partir de leite de ovelhas, leite e sítios anatômicos de cabras saudáveis e em alimentos de origem animal e fábricas de processamento, demonstraram haver espécies coagulase negativas, como *S.xylosum*, *S.haemolyticum*, *S.epidermidis*, *S.cohnii*, *S.chromogenes*, *S.warneri*, *S.sciuri*, *S.lentus*, *S.saprophyticum*, que produziam enterotoxinas em meios de cultivo laboratorial.

Assim a primazia da capacidade enterotoxigênica, que pertencia quase com exclusividade a *S.aureus*, foi estendida, embora este fato já houvesse sido relatado anteriormente, para outras espécies coagulase positivas como *S.hyicus*, *S.chromogenes* e *S.intermedius*.

Apesar da crença de que, usualmente, espécies coagulase negativas não constituíssem objeto de importância na epidemiologia das intoxicações estafilocócicas, os trabalhos ora referidos conclamam a explorações, no sentido da averiguação de espécies que as coagulase produtoras, bem como avaliar se efetivamente as quantidades produzidas são ou não suficientes para considerá-las como potencialmente toxigênicas.

Com base nas considerações acima delineadas, a presente pesquisa objetivou a avaliação de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas, oriundos de sítios anatômicos de cabras saudáveis e procedentes da Universidade de Extremadura, Cáceres, Espanha. A importância potencial destes microrganismos, frente a processos de intoxicação alimentar, foi estudada com base na capacidade de desenvolvimento e enterotoxigenidade em diferentes condições de cultivo laboratorial e através da inoculação experimental em leite integral tipo "longa vida" e presunto cozido.

Explorou-se, também, a possibilidade de otimização de uma metodologia de maior alcance voltada para enterotoxinas sintetizadas em

quantidades diminutas, correlacionando-se, paralelamente vantagens e desvantagens de métodos rápidos de detecção, como os ensaios de "ELISA - Enzyme linked-immunosorbent assay" e "RPLA - Reversed passive latex agglutination".

Concomitantemente, não negligenciando o casualismo de um surto estafilocócico envolvendo queijo tipo "Minas", em Belo Horizonte, Minas Gerais, que se ateve aos objetivos do projeto inicial desta pesquisa ou seja o estudo de linhagens produtoras de enterotoxinas em níveis não detectáveis pelos métodos tradicionais, a descrição epidemiológica e conduta analítica de elucidação do episódio em questão passaram também a compor, na íntegra, o corpo deste trabalho.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Estafilococos: histórico, aspectos taxonômicos, ecossistema e substâncias ligadas à virulência.

Os estafilococos apresentam-se na forma de cocos Gram positivos, isolados ou agrupados em cachos, pares e tétrades. São anaeróbios facultativos, não esporogênicos, produtores usuais de catalase e imóveis (KLOOS & SCHLEIFER, 1986).

Inicialmente, foram observados por KOCK, em 1878, a partir de material purulento; cultivados em meios líquidos por PASTEUR, em 1880, e, a primeira publicação que versou sobre estes microrganismos, em forma de "cocos", e sua constância em abscessos agudos e crônicos, teve lugar na Escócia, nos Idos de 1881. Foi também como decorrência destes estudos que passaram a receber a denominação de *Staphylococcus* uma vez que, quando observados microscopicamente, apresentavam-se sob forma de grãos arranjados ou dispostos como cachos de uvas (OGSTON *apud* BAIRD-PARKER, 1990).

ROSENBACH, em 1884, *apud* BERGDOLL (1989) adotou o gênero *Staphylococcus* de OGSTON, dividindo-o em duas espécies *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus albus*. Pesquisando os microrganismos em condições de cultivo laboratorial, este autor conseguiu observar a presença de colônias amarelas e brancas concluindo sobre a similar identidade deles em relação aos organismos anteriormente considerados por OGSTON (1881). Só posteriormente, veio à tona, o esclarecimento de que a pigmentação não poderia ser usada como critério de diferenciação, já que mostrava-se variável e decorrente com as condições de cultivo (WINSLOW *et al*, 1920).

O reconhecimento da extensão da patogenicidade de estafilococos até à participação destes em surtos de intoxicação alimentar só veio a ocorrer, em 1884, conforme VAUGHAN & STERNEBERG contido em DACK(1949) *apud* BAIRD-PARKER (1990). Os autores demonstraram de forma efetiva uma intoxicação ocorrida em Michigan, envolvendo pessoas que haviam ingerido queijo contaminado com estafilococos. Posteriormente, em 1914, BARBER demonstrou haver linhagens não pigmentadas como responsáveis por um surto, cujos acometidos haviam ingerido leite mastítico de vaca.

KLOOS & SCHLEIFER (1986), conforme descrito na 8ª edição do "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*", alocaram estafilococos no IV gênero da família *Micrococcaceae* que, também, se constitua de *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Com base em princípios da taxonomia numérica conduzidos através de avaliação de conteúdo de G+C, hibridização e estabilidade térmica de DNA/DNA e DNA/rRNA, catálogo seqüencial de rRNA 16S, constituintes de parede celular, composição de ácidos graxos, reações imunológicas, aspectos morfo-tintoriais, exigências nutricionais e de oxigênio, sistema de transporte de elétrons, produção de ácidos a partir de diferentes carboidratos, metabólitos finais resultantes da utilização de glicose, resistência a antibióticos e susceptibilidade a fagos específicos, os estafilococos foram distribuídos em 19 espécies mas, outras encontravam-se em fase de investigação (KLOOS & SCHLEIFER, 1986).

Segundo KLOOS (1990), com base em estudos filogenéticos de hibridização de DNA-DNA, seis grupos foram reconhecidos entre as espécies do gênero *Staphylococcus*, conforme abaixo descrito: i: 1º-Grupo de *S.epidermidis* (*S.epidermidis*, *S.capitis*, *S.caprae*, *S.saccharolyticus*, *S.warneri*, *S.haemolyticus*, *S.hominis* e *S.simians*); ii: 2º-Grupo de *S.saprophyticus* (*S.saprophyticus*, *S.cohnii* e *S.xylosus* e à margem deste grupo localizam-se, também, as espécies resistentes à novobiocina, *S.kloosii*, *S.equorum*, *S.arlettae* e *S.gallinarum*); iii: 3º-Grupo *S.simulans* (*S.simulans* e *S.carnosus*); iv: 4º-Grupo *S.intermedius* (*S.intermedius* e *S.delphini*); v: 5º-Grupo *S.hyicus* (*S.hyicus* e *S.chromogenes*); vi: 6º-Grupo *S.sciuri* (*S.sciuri* e *S.lentus*).

De acordo com esta classificação, *S.aureus* não participa de nenhum grupo. Já no estudo proposto por SCHLEIFER & KROPPENSTEDT (1990), *S.aureus* e *S.auricularis* foram associados ao grupo de *S.epidermidis*, enquanto que *S.gallinarum*, *S.kloosi*, *S.equorum* e *S.arlettae* são considerados distintos dos grupos de *S.epidermidis* e *S.saprophyticus*. Por sua vez, isoladamente, *S.caseolyticus*, *S.lugdunensis* e *S.schleiferi*, não foram, também, acomodados nos seis grupos citados.

Os questionamentos efetuados por HOOVER *et al* (1983), sobre a adequacidade de critérios de identificação utilizados na 8ª edição do "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" podem, ainda, ser tomados como consequência do contínuo emprego de métodos cada dia mais refinados como taxonomia adansoniana, quimiotaxonomia e taxonomia molecular, os quais, segundo KLOOS (1990) e SCHLEIFER & KROPPENSTEDT (1990), permitiram expressivo avanço na sistemática de *Staphylococcus*. Considerando que desde 1908, quando WINSLOW & WINSLOW *apud* BERGDOLL (1989), propuseram *S.epidermidis* como uma segunda espécie, e esta permaneceu, juntamente com *S.aureus*, constituindo as únicas

relatadas até o ano de 1972, percebe-se que com o advento da biotecnologia trazida pelos anos 80, várias novas espécies e sub-espécies foram descritas, elevadas e/ou realocadas.

A partir de 1994, *Staphylococcus* e mais outros 23 gêneros, passaram a fazer parte do "Grupo 17", de acordo com a 9ª edição do "*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*". Neste "Grupo 17", foram agrupados, apesar de certas dissimilaridades, por conveniência, aqueles gêneros que, indistintamente, se apresentam sob a forma de cocos (esféricos a ovais), em sua grande maioria Gram positivos e não formadores de endosporos. A motilidade é pouco comum entre estes e o arranjo celular e capacidade de produzir catalase constituem características principais, para separação de gêneros (HOLT *et al*, 1994).

Desta forma, havendo sofrido inclusões e redefinições, o gênero *Staphylococcus*, até o presente momento, referencia 28 diferentes espécies e oito sub-espécies (HOLT *et al*, 1994). Isto pode ser verificado, conforme reportado, sobretudo no "*International Journal of Systematic Bacteriology*" e no "*Systematic and Applied Microbiology*", onde as publicações descritivas das espécies, foram sendo, cronologicamente, assim estabelecidas: *S.warneri*, *S.capitis*, *S.hominis* e *S.simulans* (KLOOS & SCHLEIFER, 1975b); *S.epidermidis*, *S.saprophyticus*, *S.cohnii*, *S.haemolyticus* e *S.xylosum* (SCHLEIFER & KLOOS, 1975); *S.intermedius* (HAJEK, 1976); *S.saccharolyticus* (KILPPER-BÄLZ & SCHLEIFER, 1981); *S.caseolyticus* (SCHLEIFER *et al*, 1982); *S.carnosus* (SCHLEIFER & FISHER, 1982); *S.sciuri* e *S.lentus* (KLOOS *et al*, 1976; SCHLEIFER *et al*, 1983); *S.auricularis* (KLOOS & SCHLEIFER, 1983); *S.gallinarum* e *S.caprae* (DEVRIESE *et al*, 1983); *S.arletae*, *S.equorum* e *S.kloosii* (SCHLEIFER *et al*, 1984); *Staphylococcus aureus* sub-especie *anaerobius* (de la FUENTE *et al*, 1985); *S.hycus* e *S.chromogenes* (DEVRIESE *et al*, 1978; HÁJEK *et al*, 1986); *S.lugdunensis* e *S.schleiferi* (FRENEY *et al*, 1988); *S.delphini* (VARALDO *et al*, 1988); *S.felis* (IGIMI *et al*, 1989); *S.capitis* sub-especie *ureolyticus* (BANNERMAN & KLOOS, 1990); *S.schleiferi* subsp.*coagulans* (IGIMI *et al*, 1990); *S. cohnii* susp. *cohnii*, e *S. cohnii* susp. *urealyticum* (KLOOS & WOLFSHOHL, 1991).

Dentre estas espécies, para efeito de discriminação laboratorial, *S.aureus* sub-especie *anaerobius* e sub-especie *aureus*, *S.delphini*, *S.intermedius* e *S.schleiferi* subsp.*coagulans* são produtores de coagulase livre; *S.hycus* é produtor variável e os demais não a produzem. No que tange à diferenciação de *S.aureus* sub-especie *anaerobius* e *S.aureus* sub-especie *aureus* esta reside basicamente na incapacidade, do primeiro, de se desenvolver em condições de aerobiose e de produzir "clumping factor" ou coagulase ligada.

Segundo KLOOS (1990), os estafilococos estão amplamente distribuídos na natureza. O maior habitat inclui a pele, suas glândulas e membranas

mucosas de mamíferos e pássaros. Podem também ser encontrados em diferentes regiões do corpo como garganta, faringe, glândulas mamárias e trato intestinal e urinário. Esporadicamente, já foram detectados no solo, partículas de poeira e ar, sedimentos marinhos, águas frescas, esgoto, superfície de plantas, carne e leite e seus sub-produtos e outros alimentos.

Algumas espécies de estafilococos parecem demonstrar preferências por um hospedeiro ou nicho caracterizando cepas, que externam algumas dissimilaridades fenéticas e apresentam entre si significativa diferença de perfil de DNA. KLOOS & WOLFSHOHL (1979) e KLOOS (1980) reportaram sobre a hipótese de evolução conjugada de hospedeiro-parasita e, utilizando técnicas de reassociação de DNA-DNA, os primeiros autores demonstraram que linhagens de *S. haemolyticus* e *S. warneri*, procedentes de nichos humano e não humano, não apresentavam homologia de DNA, sendo possível observar uma clara separação entre eles. Estes autores relataram ainda que são raras as ocasiões em que *S. epidermidis* pode ser encontrado em outros mamíferos, comportando-se efetivamente como população transitória, presumidamente em decorrência de contato humano.

Segundo NOBLE (1990), a associação de uma determinada espécie de *Staphylococcus* com um determinado nicho ou ecossistema tem sido observada, entre outros, para *S. intermedius* em carnívoros, *S. auricularis* em orelha humana, *S. xylosus* e *S. sciuri* em substratos menos enriquecidos (por não exigirem nitrogênio como fonte orgânica), *S. aureus* em pele de primatas (tendo nestes seu nicho natural) e em fossas anteriores nasais sobretudo de adultos humanos, seu ecossistema preferencial. Este autor reporta ainda que, apesar da preferência de habitat, poucas espécies são confinadas a um hospedeiro particular.

Com base nos termos de expressão fenética, estas características de dissimilaridades já haviam sido constatadas e estudadas em linhagens de *S. aureus* oriundas de hospedeiro humano e animal. Entre outros, o esquema classificatório proposto por HÁJEK & MARSALEK (1971) conseguiu alocar linhagens de *S. aureus* em seis distintos biótipos (A a F). Tendo em vista a expansão e aplicabilidade desta subtipagem, DEVRIESE & OEDING (1976), adicionaram alguns testes ao esquema então proposto, para atender, principalmente, cepas procedentes de aves. Foi com DEVRIESE (1984), que se preconizou um sistema mais simplificado de biotipagem para *S. aureus* de diferentes origens. O autor passou a distinguir linhagens do homem e animais, em ecovars (hospedeiro específico) e biótipos (hospedeiro não específico), com auxílio de testes de β -hemolisina, estafiloquinase, coagulase a partir de plasma bovino e reação de cristal violeta, conseguindo discriminar 604 entre 809 amostras de diferentes procedências, que se distribuíram em quatro ecovars (homem, aves, ovinos, caprinos e bovinos). As outras cepas foram enquadradas em cinco biótipos.

Em dias atuais, técnicas de tipagem molecular utilizando enzimas de restrição vêm sendo utilizadas, tendo em vista o conhecimento do perfil genômico, através da busca de plasmídeos e genes responsáveis por resistência a antibióticos ou outros marcadores epidemiológicos, conforme já observado para *S.aureus*, *S.warneri*, *S.capitis*, *S.epidermidis*, *S.cohnii*, *S.xylosus* e *S.saprophyticus* (KLOOS *et al*, 1979; KLOOS *et al*, 1981; PARISI *et al*, 1986; KLOOS, 1990).

Conforme reportado por GOERING & BAUERFEIND (1990), a utilização de fragmentos macropoliméricos de DNA cromossômico, através de eletroforese em campo pulsante, após clivagem com endonuclease *Sma* I, apresentou boa resolução para linhagens de *S.aureus* procedentes de fibrose cística. Por essa técnica, detectaram números satisfatórios, inferiores a 20 bandas. De forma idêntica, a associação de enzimas de restrição, com a técnica de "PCR - Polymerase Chain Reaction", já vem sendo testada e se mostrou útil como instrumento para diferenciação de linhagens estafilocócicas de origem bovina (MATTHEWS & OLIVER, 1994).

Seguindo a mesma linha de metodologias com enfoque ao estudo de perfil genômico, trabalho conduzido por OKOJI *et al* (1993), contrariamente, demonstrou a inadequacidade do emprego de sondas de oligonucleotídeos e mesmo hibridização de DNA, quando se buscou a correlação existente entre 27 isolados de *Staphylococcus aureus* e seus respectivos genes codificadores de produção de enterotoxinas como possíveis marcadores genéticos. Os resultados obtidos evidenciaram linhagens 100% reativas, pelo menos, à uma sonda, porém, apenas, 55% destas mostraram-se fenotipicamente enterotoxigênicas, quando seus fluidos sobrenadantes foram testados pelo método de aglutinação reversa passiva em látex. Os autores sugeriram que certo número de *S.aureus* albergavam seqüências de DNA aparentemente silenciosas ou cópias mutantes dos genes codificadores da produção de enterotoxinas.

Desta forma, a tradicional identificação de estafilococos, através da análise lisogênica ainda dispõe de aceitabilidade como sistema bem estabelecido de tipagem, conduzindo-se através do conjunto internacional de fagos, para cepas de *S.aureus* de origem humana e se encontra em fase de desenvolvimento para estirpes de origem animal (BLAIR & WILLIAMS, 1961; KLOOS, 1990). Esta técnica é amplamente aceita e constitui um modelo simples e de boa resolução para *S.aureus*, atendendo de forma abrangente o perfil de linhagens epidêmicas. Em função da aplicabilidade e qualidade de resultados fornecidos pela fagotipagem, parece existir uma tendência de se estender a pesquisa de fagos a outros estafilococos, principalmente, em se considerando a emergência de novas espécies (NOBLE, 1990).

Considerando as perspectivas de rastreamento epidemiológico, alguns autores como WIENEKE & GILBERT (1987) relataram a inexistência de correlação entre capacidade enterotoxigênica e sensibilidade fágica, muito embora o relato de IARIA *et al* (1980) indique que a tendência observada, sobretudo, para trabalhos efetuados no Brasil, é de predominância do grupo fágico III, tanto para cepas procedentes de alimentos implicados em surtos como para isolados de portadores humanos, e que as enterotoxinas mais incidentes, em ambos, de acordo com pesquisas no Brasil e no exterior, são "SEA" e "SEB" (BERGDOLL, 1989).

A aquisição de linhagens estafilocócicas com perfil de resistência modificado e quantitativamente diferenciadas daquelas albergadas exteriormente ao ambiente considerado, segundo HUTZLER *et al* (1972), não deve ser desconsiderada uma vez que, é uma tendência natural a qual, principalmente, servidores hospitalares e pacientes estão sujeitos. De acordo com CARDOSO *et al* (1988), entre 349 amostras de *S.aureus* isolados das mãos de grupos de servidores intra e extra-hospitalares, cerca de 89,74% destas mostraram-se resistentes a meticilina. Estes dados, no Brasil, são atualmente confirmados por DARINI *et al* (1994) e SOARES *et al* (1995), que estudaram perfil de multiresistência de *S.aureus* à este antimicrobiano.

As diretrizes de pesquisa adotadas em análise de alimentos envolvidos em surtos, têm como objetivo a determinação do agente etiológico, a avaliação de sua capacidade enterotoxigênica e o rastreamento da possível fonte de contaminação. Logo, a identificação de espécies é inicialmente conduzida através da avaliação do comportamento bioquímico, fisiológico e morfo-tintorial das linhagens testadas.

Historicamente, como nos procedimentos de pesquisa clínica, os estafilococos vêm sendo analisados em alimentos, de forma dicotômica, com base na habilidade ou não de coagular o plasma sanguíneo uma vez que é universalmente referenciada a intrínseca relação entre a produção de coagulase e a disponibilidade de *S.aureus* produzir enterotoxina.

Além da coagulase, outros fatores de virulência ou indicadores de patogenicidade são utilizados em microbiologia de alimentos uma vez que, em se tratando de suspeitas de intoxicação estafilocócica, a determinação da capacidade enterotoxigênica do agente etiológico constitui ponto crítico para o fechamento de conclusões, no processo de investigações epidemiológicas.

Considerando-se que, mesmo em países desenvolvidos, poucos são os laboratórios que dispõem de condições técnicas para verificar a capacidade

enterotoxigênica de estafilococos, bem como efetuar a pesquisa de suas enterotoxinas no alimento, alguns critérios primários como a produção de coagulase, termonuclease (Tnase) e sensibilidade à lisostafina constituem os indicadores mais largamente aceitos para presuntiva evidência desta propriedade.

I - A enzima extracelular denominada coagulase livre exerce um efeito clínico de coagulação do plasma humano e de outros animais, por ativação da protrombina resultando na conversão do fibrinogênio em fibrina com conseqüente decréscimo do primeiro, na corrente sanguínea (BLOBEL & BERMAN, 1961; FOSTER & McDEVITT, 1994). A pesquisa desta enzima em análise de alimentos foi levada a efeito, sobretudo, a partir de estudos revisados por MORRISSON (1962). O procedimento deste teste passou por diferentes critérios de interpretação. TURNER *et al* (1958) consideravam como positivos todos resultados que indicavam, em tubos de ensaios, algum grau de coagulação (1+ a 4+); SPERBER & TATINI (1975) consideravam somente o coágulo (4+), aquele que não se movia, mesmo, com a inversão do tubo, como capaz de conferir positividade ao teste. Chegaram a afirmar que esta reação poderia assegurar de forma definitiva, a identificação de *S.aureus*. Vários estudos e procedimentos de análise referenciam a pesquisa de coagulase livre como principal teste indicador de enterotoxigenidade para estafilococos (CHAPMAN *et al*, 1937; HUSSEMAN & TANNER, 1949; EVANS & NIVEN, 1950; EVANS *et al*, 1950; BAER, 1966; LACHICA *et al*, 1969; PAYNE & WOOD, 1974; SANDERS, 1974; RAYMAN *et al*, 1975; TATINI *et al*, 1976; ICMSF, 1983; FDA, 1992; VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992). Mais recentemente, o teste de coagulase em lâmina, capaz de detectar a coagulase ligada ("clumping factor"), um fator enzimático associado à célula que interage diretamente com a porção Fg do fibrinogênio do plasma e provoca a agregação de *S.aureus*, vem sendo usado e recomendado por manuais normativos internacionais, não apenas como indicador de enterotoxigenidade, mas também como prova útil à diferenciação de espécies (ESSERS & RADEBOLD, 1980; PHILLIPS & KLOOS, 1981; MYRICK & ELLNER, 1982; BODEN & FLOCK, 1989; VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992; HOLT, 1994).

II - A enzima termonuclease (Tnase) é uma fosfo-diesterase que se responsabiliza pela produção de 3' fosfo-mononucleotídeos, tanto pela clivagem de DNA como RNA. Trata-se de uma proteína globular, que é constituída de uma cadeia polipeptídica simples e que não se associa a coagulase negativos mas à grande maioria de *S.aureus* coagulase positivos e outras espécies bacterianas (LACHICA *et al*, 1969; RAYMAN *et al*, 1975; SPERBER & TATINI, 1975; NISKANEN & KOIRANEN, 1977; PARK *et al*, 1980). A Tnase apresenta estabilidade térmica e pelo fato de ser liberada no meio extracelular em grandes quantidades, quando a densidade populacional atinge níveis de 10^6 UFC/g, embora não tão usual em extratos de alimentos suspeitos, pode ser viabilizada (LACHICA *et al*, 1972; TATINI *et al*, 1975; PARK *et al*, 1978).

III - A lisostafina é um fator lítico o qual, mostra específica atividade contra estafilococos. O processo de lise é causado pela ação da enzima peptidase que ataca as ligações glicil-glicina, nas pontes cruzadas do peptidoglicano da parede celular (BROWDER *et al*, 1965 *apud* GUTIERREZ *et al*, 1981). Parece existir uma elevada correlação entre composição do peptidoglicano e susceptibilidade à lisostafina. Linhagens coagulase positivas demonstram maior grau de sensibilidade que as coagulase negativas, acontecendo nestas muito poucas linhagens sensíveis (LACHICA *et al*, 1971; KLOOS & SCHLEIFER, 1975a; SCHLEIFER & KLOOS, 1975). Segundo GROSSGEBAUER *et al* (1968), a utilização desta reação poderia suplantar o teste de coagulase na distinção entre linhagens toxigênicas e não toxigênicas de *S.aureus*, embora outros autores tenham emitido opiniões diferentes (GUTIERREZ *et al*, 1981; BENNETT *et al*, 1986).

É necessário considerar que estes fatores correlacionados com a capacidade enterotoxigênica atêm-se a estudos basicamente dirigidos a *S.aureus*, sem dúvida a espécie comumente envolvida em surtos estafilocócicos. Entretanto, o reconhecimento de interesse por espécies coagulases negativas e de outras que *S.aureus*, muitas delas, de origem animal, tiveram sua importância ressaltada, e assim tais indicadores não estariam abrangendo, de forma ampla, o atual universo de estafilococos enterotoxigênicos.

2.2 - Estafilococos em portadores humanos

Diversos trabalhos têm relatado a composição da microbiota humana. Dentre os microrganismos Gram positivos, os estafilococos destacam-se como importante grupo, cuja presença se faz observar sobretudo na pele e mucosas do homem estendendo-se, de forma generalizada, a animais de sangue quente (KLOOS & MUSSELWHITE, 1975; KLOOS & SCHLEIFER, 1975ab; KLOOS *et al*, 1976; KLOOS, 1980; LENETTE *et al*, 1980; KLOOS & SCHLEIFER, 1986). Os estafilococos metabolizam, na superfície da pele e mucosas produtos secretados por glândulas locais, desempenhando com isto papel preventivo na colonização de outros microrganismos patogênicos (BAIRD-PARKER, 1990). A relação entre estafilococos e hospedeiro pode tornar-se mais estreita quando barreiras naturais de proteção estão comprometidas, seja por lesões, práticas médicas que envolvam cirurgia, implantação de próteses ou por terapia imunossupressiva (KLOOS, 1980).

Em sítios anatômicos do corpo humano tais como axila, cabeça, pernas e braços predominam *S.hominis*, *S.epidermidis*, *S.capitis* e *S.haemolyticus*. *S.simulans*, *S.xylosum*, *S.cohnii*, *S.capitis*, *S.saprophyticus*, *S.haemolyticus*, *S.hyicus* subsp.*chromogenes* e *S.warneri* foram aleatoriamente isolados em diferentes regiões, na superfície da pele (KLOSS & MUSSELWHITE, 1975; GARCÍA *et al*, 1986; McGINLEY *et al*, 1988).

Ainda que possa colonizar-se em diferentes regiões do organismo, existe um consenso de que o maior reservatório para *S.aureus* sejam as fossas nasais. A cavidade orofaríngea é igualmente relatada como muito freqüente. A presença nas mãos e outras superfícies, resulta de vínculo epidemiológico decorrente de disseminação a partir dos principais sítios (MUNCH-PETERSEN, 1961; WILLIAMS, 1963; MALAKI *et al*, 1973; CARDOSO *et al*, 1988; RADDI *et al*, 1988).

A **Tabela 1**, p. 13, mostra a localização de *S.aureus*, em portadores humanos, catalogação feita principalmente para as publicações do Brasil.

Fato a se ressaltar reside na natureza ubiqüitária dos estafilococos, principalmente *S.aureus*, que, a partir do homem, torna-se facilmente disseminável até aos alimentos, distribuindo-se também no ambiente e podendo serem localizados no ar, poeira e águas de esgoto e, aí virem a constituir problemas quando atingem locais como hospitais, consultórios odontológicos e indústrias de alimentos (MENDONÇA & SOLÉ-VERNIN, 1978; AUTIO *et al*, 1980; SOUREK, 1980; BENNETT *et al*, 1986; PARKER *et al*, 1987; REED *et al*, 1989; WILLIAMSON *et al*, 1992; O'DONNELL, 1993; BAIRD-PARKER, 1994).

Assim o portador de estafilococos enterotoxigênicos, enquanto manipulador de alimentos, representa indiscutível elo na cadeia epidemiológica da intoxicação alimentar (BRYAN, 1978; BRYAN, 1980; IARIA *et al*, 1980; BERGDOLL, 1989; CRICKSHANK 1990; TRANTER, 1990).

Ampliando o perfil epidemiológico de estafilococos em portadores humanos, DANIELSON & HELBERG (1984) relataram a presença de espécies coagulase negativas produtoras de enterotoxinas. Estes autores demonstram que, de 44 amostras detectadas em sítios anatômicos de funcionários de um frigorífico, quatro eram constituídas por *S.epidermidis*. Mais recentemente, no Brasil, PEREIRA *et al* (1995), detectaram coagulase negativos produtores de "SE" em estudantes de odontologia e OLIVEIRA *et al* (1995) isolaram de manipuladores de alimentos *S.warneri* e *S.epidermidis* que produziam "SEC" e "SEC" e "SEA", respectivamente. No que tange a outras espécies coagulase positivas, HERRERO *et al* (1989ab), isolaram, além de *S.aureus*, também *S.hyicus* e *S.intermedius* enterotoxigênicos em portadores

Tabela 1 - *S. aureus* em portadores humanos

Local	Categoria e número de portadores	Sítio	Prevalência <i>S. aureus</i> %	Publicação
Richmond, USA	Pessoal de odontologia (355)	Vn	42,3	KNIGHTON (1960)
Rio de Janeiro, Brasil	Estudantes de odontologia (49)	Vn/Of	80,8/70,1	ARAÚJO & ZEBRAL (1961)
Richmond, USA	Estudantes de odontologia (74)	Vn/S	46,1/46,6	KNIGHTON (1962)
Londres, Inglaterra	Pacientes de hospital (2925)	Vn	40,5	NOBLE <i>et al</i> (1964)
Richmond, USA	Estudantes de odontologia (70)	Vn/Of	41,7/47,5	KINIGHTON (1965)
São Paulo, Brasil	Pacientes de hospital (85)	Vn/Of	42,3/42,3	HUTZLER <i>et al</i> (1972)
Beilim, Alemanha	Manipuladores de alimentos (268)	Vn+Of	36,9	UNTERMAN (1972)
São Paulo, Brasil	Indivíduos saudáveis (60)	S	86,6	PIOCHI & ZELANTE (1973)
Teerã, Irã	Manipuladores de alimentos (510)	Vn/Of/M	37,2/7,7/27,6	MALAKI <i>et al</i> (1973)
São Paulo, Brasil	Manipuladores de alimentos (34)	Vn	35,3	IARIA <i>et al</i> (1980)
São Paulo, Brasil	Estudantes de odontologia (28)	Vn	35,7	DAMETTO & ZELANTE (1981)
São Paulo, Brasil	Indivíduos saudáveis (130)	Vn+B	36,1	ZELANTE <i>et al</i> (1982)
Rio de Janeiro, Brasil	Crianças (64)	Vn/Of/Lp	44,1/4,6/31,2	BENCHEITRI <i>et al</i> (1982)
Uppsala, Suécia	Funcionários de frigorífico (86)	Vn/Of	54,6/6,9	DANIELSON & HERBERG (1984)
Kaduna, Nigéria	Mães amamentando (251)	Lm	71,3	ADEKEYE & ADESIYUN (1984)
Ribeirão Preto, Brasil	Indivíduos saudáveis (16)	Vn/Of	100/37,5	ARAÚJO <i>et al</i> (1985)
Léon, Espanha	Manipuladores de alimentos (300)	Vn	41,3	GARCÍA <i>et al</i> (1986)
Araraquara, Brasil	Indivíduos saudáveis (68)	Vn/M	44,1/34,8	RADDI <i>et al</i> (1988)
Ribeirão Preto, Brasil	Estudantes de odontologia (318)	Vn/Of/S	39/52,2/74,2	SALVADOR <i>et al</i> (1989)
Maringá, Brasil	Funcionários de hospital (70)	Vn	75,7	HERRERO <i>et al</i> (1992)
Rio de Janeiro, Brasil	Mães amamentando (55)	Lm	10	ALMEIDA <i>et al</i> (1993)
Belo Horizonte, Brasil	Manipuladores de alimentos (55)	Vn+Of+Ls	54,5	PEREIRA <i>et al</i> (1994a)
Belo Horizonte, Brasil	Mães amamentando (19)	Lm	100	PEREIRA <i>et al</i> (1995)
Belo Horizonte, Brasil	Pessoal de odontologia (35)	Vn+Of/Ls	71,4/28,6	PEREIRA <i>et al</i> (1996b)
Rio de Janeiro, Brasil	Manipuladores de alimentos (95)	Vn+M	50,5	SOARES <i>et al</i> (1995)

B: Boca; Lm: Leite materno; Ls: Leite subungueal; Lp: Lesão de pele; M: Mãos; Of: Orofaringe; S: Saliva; Vn: Vestíbulo nasal

assintomáticos. Estes dados permitem admitir a existência de outras espécies além de *S.aureus*, tanto coagulase positivas como negativas, em manipuladores de alimentos, o que é de real importância na epidemiologia e diagnóstico de intoxicação alimentar.

A maior frequência de surtos resultam, sobremaneira, de contaminação através de manipuladores que apresentam algum tipo de lesão estafilocócica de pele. Este dado pode ser ilustrado através do relato de dois surtos epidemiologicamente estudados. Um ocorreu em 1983, na Califórnia, USA, e envolveu centenas de crianças acometidas de intoxicação, por ocasião da páscoa, quando ingeriram ovos achocolatados preparados por manipulador que apresentava lesões infectadas com *S.aureus* produtor de "SEB"; as linhagens de *S.aureus* isoladas, concomitantemente, do manipulador e dos ovos preparados apresentaram o mesmo perfil lisogênico e enterotoxigênico (MERRIL *et al*, 1984). O outro surto, teve lugar em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, em 1993, e foi resultado da contaminação acidental de um bolo recheado, de aproximadamente 6kg, por manipuladora que apresentava lesões no pescoço; foi detectada a presença de enterotoxina A no bolo incriminado e células viáveis de *S.aureus* também produtor de "SEA" no alimento e na ferida da manipuladora (PEREIRA *et al*, 1994b).

2.3 - Estafilococos em reservatórios animais

É de conhecimento comum que animais podem desenvolver infecções estafilocócicas e, também, muitos carregam o microorganismo nas narinas e outros sítios anatômicos. Estudos a respeito da enterotoxigenidade de estafilococos estão limitados a algumas poucas espécies animais e portadores são considerados menos importantes, uma vez que a maior causa de intoxicação alimentar é decorrente de contaminação por manipuladores. Isto pode ser explicado pelo fato de que os surtos são resultantes de contaminação e crescimento do microorganismo no alimento, após este ter-se submetido a tratamento térmico, propiciando aí, com a redução ou eliminação da microbiota presente, a produção de enterotoxinas. Assim, leite e carnes cruas encontram-se frequentemente contaminadas com estafilococos, mas estes são destruídos pelo tratamento térmico e, se porventura este é aplicado de maneira ineficaz, a própria microbiota acompanhante é na maioria das vezes capaz de impedir, como fracos competidores que são, o desenvolvimento dos estafilococos presentes (BERGDOLL, 1989).

A maior possibilidade de produção de enterotoxina em alimentos, através de estafilococos transferidos de fonte animal, está vinculada ao leite de animais com mastite, conforme pode ser observado no surto relatado por WEED *et al* (1943), no qual os autores descrevem o envolvimento e morte de duas crianças de quatro e três anos de idade, que ingeriram leite infectado proveniente de cabra com mastite.

O reconhecimento da presença de *S.aureus* em processos mastíticos dispõe de significativa divulgação científica, da mesma maneira que, espécies coagulase negativas têm sido relatadas em infecções sub-clínicas, através de presença confirmada em sítios anatômicos de bovinos, caprinos, caninos, equinos, ovinos e suínos. Diversos trabalhos exemplificam a incidência particularizada de estafilococos no úbere e conseqüentemente, no leite cru procedente de fêmeas mastíticas, quer esteja a infecção em sua forma clínica ou sub-clínica. O leite, nestas condições, poderá ser, indevidamente, o que ocorre na maioria das vezes, incorporado ao leite de fêmeas normais, nas usinas de processamento. A mastite representa assim, além de séria ameaça à produção leiteira, perigoso veículo de infecções para o homem (SMITH & ROGUINSKY, 1977; MARDH *et al*, 1978; KLOOS, 1980; SHELDRAKE *et al*, 1981; HUNTER, 1984; LERONDELLE & POUTREL, 1984; POUTREL, 1984; HARVEY & GILMOUR, 1985; DEVRIESE *et al*, 1985).

No Brasil, dados relativos a processos de mastite bovina em regiões leiteiras do Rio de Janeiro, Pernambuco, São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais foram relatados por LANGENEGGER *et al* (1970), HARROP *et al* (1975), FERREIRO (1978), FERREIRO *et al* (1981), NADER FILHO *et al* (1983, 1984, 1985) e COSTA *et al* (1995) que, demonstraram ser *S.aureus* e/ou *Staphylococcus* sp. os microrganismos prevalentes em índices de, aproximadamente, até 52%. A caracterização de enterotoxigenidade de culturas de *S.aureus* isoladas de leite mastítico, no Brasil, onde os autores buscaram as amostras, diretamente do rebanho foi, até o momento, somente verificada em três trabalhos: ARAUJO (1984) *apud* FREITAS & MAGALHAES (1990), FURLANETTO *et al* (1987) e FREITAS & MAGALHAES (1990). Estes autores revelaram índices de 8%, 1,1% e 0,5% de positividade para *S.aureus* produtores de, "SEA", "SEA"/"SEC" e "SEB", respectivamente, nas amostras analisadas. Através da avaliação de dados apresentados por OLSON *et al* (1970), ADEKEYE (1980), GARCIA *et al* (1980), REA *et al* (1980), GUTIERREZ *et al* (1982), KUMAR & GUPTA (1983) e ABBAR *et al* (1986), é possível observar que, também para países outros que o Brasil, a incidência de *S.aureus* enterotoxigênico, em amostras de leite mastítico procedentes de gado bovino, não é significativamente elevada.

A **Tabela 2**, p.17 e 18, relaciona a presença de *S.aureus*, tipo de enterotoxina produzida e outros estafilococos, em pesquisas mais significativas a partir de amostras de leite, sítios anatômicos e material clínico de animais.

No Brasil, que culturalmente mantém-se atrelado ao consumo de leite bovino, quase com total exclusividade, são de pouco ou nenhum conhecimento relatos de pesquisas microbiológicas voltadas para sítios anatômicos e leite de ovínos e caprinos, o que, de forma diferente, há muito, acontece em outros países (SMITH & ROGUINSKY, 1977; HÁJEK, 1978; GUTIERREZ *et al*, 1982; De BUYSER *et al*, 1987; BAUTISTA *et al*, 1986; BAUTISTA *et al*, 1988; HARVEY & GILMOUR, 1988).

Foi contudo, em 1990, que VALLE e colaboradores avaliaram a habilidade de diferentes espécies estafilocócicas provenientes de pele, mucosa nasal e leite de 133 fêmeas assintomáticas produzirem enterotoxinas. De um total de 342 isolados, "SE" foi produzida por 74,3% de 70 linhagens coagulase positivas e por 22% das linhagens coagulase negativas estudadas. Maior enterotoxigenidade foi revelada a partir de amostras coletadas da superfície do úbere, tetas e leite, sendo a enterotoxina C predominante, alcançando 67,9% de detecção. Foram relatados, por uma primeira vez, *S.chromogenes*, *S.warneri*, *S.sciuri*, *S.saprophyticus* e *S.lentus*, como espécies coagulase negativas e pauciprodutoras de enterotoxinas, ampliando o reservatório de linhagens que, pressupõem fonte de contaminação para alimentos que se destinam ao consumo humano.

Ainda, com vistas ao seu papel de agente disseminador de doenças ao homem, a presença de estafilococos, pode ser relacionada a partir de trabalhos conduzidos com cães, frangos e suínos (HÁJEK & MARSALEK, 1973; HÁJEK, 1976; DEVRIESE, 1977; KATO *et al*, 1978; SHIOZAWA *et al*, 1980; KAJI & KATO, 1980; ADESIYUN *et al*, 1984; FUKUDA *et al*, 1984; DE LA FUENTE *et al*, 1986; MULLER *et al*, 1986; HIROOKA *et al*, 1988; PHILLIPS & KLOSS, 1981).

A interconexão de linhagens de origem humana e animal foi demonstrada por ADEKEYE (1980), que avaliou o comportamento de *S.aureus* isolado de diferentes fontes animais e humanas. Segundo o autor, uma proporção significativa de biótipos animais são enterotoxigênicos, gerando riscos quando produtos alimentícios são por estes contaminados. Por outro lado, em processos de infecções estafilocócicas ocorre a prevalência de diferentes biótipos em um único hospedeiro e é observada também uma alta incidência de biótipos humanos em animais, como decorrência da estreita associação ambiental destes. Esta informação foi confirmada por ADESIYUN & USMAN (1983), que detectaram linhagens produtoras de "SEC" a partir

Tabela 2 - Estafilococos em amostras de leite, sítios anatômicos e lesões de diferentes tipos de animais

Animal/Local	Sítio/Substrato	Estafilococos prevalentes	"SE"	Publicação
Bovinos				
Washington, USA	Leite mastítico	<i>S. aureus</i>	C, D	OLSON <i>et al</i> (1970)
Bélgica	Pele e lesões	<i>S. hyicus</i> subsp. <i>hlycus</i>	Nd	DEVRIESE & DERYCKE (1979)
León, Espanha	Leite mastítico	<i>S. aureus</i>	C, D	GARCÍA <i>et al</i> (1980)
Juiz de Fora, Brasil	Leite mastítico	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	Nd	FERREIRO <i>et al</i> (1981)
Barretos, Brasil	Leite mastítico	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	Nd	NADER FILHO <i>et al</i> (1983)
Jaboticabal, Brasil	Leite mastítico	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	Nd	NADER FILHO <i>et al</i> (1984)
Ribeirão Preto, Brasil	Leite normal	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	Nd	NADER FILHO <i>et al</i> (1985)
Mosul, Iraque	Leite mastítico	<i>S. aureus</i>	C, D	ABBAR <i>et al</i> (1986)
Barretos, Brasil	Leite mastítico	<i>S. aureus</i>	A, C	FURLANETTO <i>et al</i> (1987)
Caratinga, Brasil	Leite mastítico	<i>S. aureus</i>	A	FREITAS & MAGALHÃES (1990)
Tóquio, Japão	Leite normal	<i>S. aureus</i>	Nd	UMEKI <i>et al</i> (1992)
MG e SP, Brasil	Leite mastítico	<i>Staphylococcus</i> sp	Nd	COSTA <i>et al</i> (1995)
Canídeos				
Sapporo, Japão	Ceco e reto	Biótipo E	A	KATO (1978)
Sapporo, Japão	Corpo e lesões	Biótipos E e A	C, A	KAJI & KATO (1980)
Zaire, Nigéria	Narina e dorso	Biótipo E	C, A, B	ADESIYUN & USMAN (1983)
Tóquio, Japão	Material clínico	<i>S. intermedius</i>	A	FUKUDA <i>et al</i> (1984)
Madrid, Espanha	Narina e lesões	<i>S. aureus</i> / <i>S. intermedius</i>	A, B, C	de LA FUENTE <i>et al</i> (1986)
Londrina, Brasil	Lesões	<i>S. aureus</i> / <i>S. intermedius</i>	Nd	MULLER <i>et al</i> (1986)
Londrina, Brasil	Lesões	<i>S. aureus</i> / <i>S. intermedius</i>	C, D, E	HIROOKA <i>et al</i> (1988)

Tabela 2 (continuação)

Caprinos				
Nova York, USA	Úbere mastítico	Hemólise negativos e positivos	Nd	SMITH & GROGUINSKI (1977)
Belfast, Reino Unido	Leite normal	<i>S. aureus</i> / <i>S. epidermidis</i> / <i>S. simulans</i>	C	HARVEY & GILMOUR (1988)
Paris, França	Leite normal	<i>S. caprae</i> / <i>S. epidermidis</i> / <i>S. aureus</i> *	C*	De BUYSER <i>et al</i> (1987)
Glenfield, Austrália	Leite mastítico	Coagulase negativos/ <i>S. aureus</i>	Nd	SHELDRAKE <i>et al</i> (1981)
Cáceres, Espanha	Leite, úbere, tetas	<i>S. aureus</i> /Coagulase negativos	A, B, C	VALLE <i>et al</i> (1990)
Aves				
Belfast, Reino Unido	Carcaças	<i>S. aureus</i> (biótipo E)	A	GIBBS <i>et al</i> (1978)
Sapporo, Japão	Lesões	<i>S. aureus</i>	C, D	SHIOZAWA <i>et al</i> (1980)
Ovinos				
Olomouc, Bósnia	Narinas e úbere	<i>S. aureus</i>	C	HÁJEK (1978)
León, Espanha	Leite mastítico	<i>S. aureus</i> */Coagulase negativos	C*	GUTIERREZ <i>et al</i> (1982)
Madrid, Espanha	Leite normal	<i>S. aureus</i> /Coagulase negativos	Nd	BAUTISTA <i>et al</i> (1986)
Suínos				
Bélgica	Narinas e orelhas	<i>S. hyicus</i> coagulase positivo	Nd	DEVRIESE (1977)
Raleigh, USA	Material clínico	<i>S. hyicus</i> coagulase positivo	Nd	PHILLIPS & KLOOS (1981)
Bélgica	Corpo	<i>S. hyicus</i> coagulase negativo	+	ADESIYUN <i>et al</i> (1984)

SE: Enterotoxina estafilocócia Nd: Não detectada +: "SE" não especificada

de cães e, com base em dados fornecidos pela coagulação de plasma humano e canino e perfil hemolítico, grande proporção dos isolados obtidos não eram biótipos canídeos, mas, provavelmente, biótipos humanos.

2.4 - *Estafilococos pauciprodutores de enterotoxinas*

Bastante restrita é a literatura que, até o presente momento, tratou sobre a existência e importância de estafilococos (coagulase positivos e negativos) pauciprodutores de "SE". Foi somente graças ao refinamento de metodologias analíticas, como as técnicas de "ELISA" e "RPLA", que se viabilizou a revelação de cepas com tais características. Conseqüentemente, questionamentos passaram a existir a respeito da baixa produção de enterotoxinas e o possível papel que poderiam desempenhar em processos de intoxicação alimentar.

O primeiro trabalho que trouxe à evidência a existência de *S. aureus* pauciprodutor de "SE" foi reportado por REISER *et al* (1983), em Madison, Wisconsin, quando purificaram a toxina "TSST"-1. Neste experimento, algumas linhagens apresentaram produção concomitante de "SEC" em quantidades abaixo de 100ng/ml, não detectadas pelo método "OSP". Posteriormente, em estudos realizados com isolados de *S. aureus* associados à síndrome do choque tóxico e infecções clínicas e com amostras procedentes de fezes de indivíduos saudáveis, surtos de intoxicação alimentar e alimentos comercialmente vendidos em Tóquio, Japão, IGARASHI *et al* (1986) demonstraram, pelo método de "ELISA", linhagens que produziam "TSST"-1 em quantidades tão baixas quanto 1ng/mL. Os autores entenderam como significativos os baixos níveis de produção observados e consideraram o fato de que a produção de "TSST"-1, evidenciada pelo método de "RPLA", por, pelo menos, uma linhagem que havia sido considerada negativa pelo método "OSP", representava uma importante descoberta, muito embora, restasse sem resposta se a ínfima quantidade de enterotoxina produzida "in-vitro" seria quantidade suficiente para desencadear a síndrome "in-vivo" (IGARASHI *et al*, 1986).

Por outro lado, isolados de *S. aureus* procedentes de alimentos implicados em surtos ocorridos nos Estados Unidos, pelos métodos então usados, mostraram-se negativos para a produção de "SEA", "SEB", "SEC", "SED" e "SEE" mas, paradoxalmente assim se achou, produziam reação emética em macacos, o que se levou a pensar que enterotoxinas ainda não identificadas é que teriam sido as responsáveis pela causa dos surtos (KOKAN & BERGDOLL, 1987).

EVENSON *et al* (1988) relataram um surto de intoxicação alimentar que teve lugar em uma instituição educacional nos Estados Unidos. As crianças envolvidas haviam ingerido leite achocolatado contendo 0,4-0,7ng/mL de toxina e a dose tóxica foi caracterizada como de 100-200ng de "SEA". A elucidação deste surto permitiu a reformulação de conceito emitido por REISER *et al* (1974) de que 1µg de enterotoxina representava a menor dose necessária para se estabelecer a intoxicação estafilocócica.

Antes da ocorrência deste fato KOKAN & BERGDOLL (1987) haviam dado início ao estudo de linhagens pauciprodutoras de enterotoxinas. Os autores trabalharam com linhagens coletadas no decorrer de vários anos: 38 a partir de alimentos implicados em surtos; 25 de outros alimentos; 11 de peixes crus; 26 de fossas nasais humana; 4 de narinas animal e 6 de diferentes procedências. Estes isolados perfaziam um total de 110 amostras e eram pertencentes ao catálogo do "Food Research Institut", Madison, Wisconsin, USA. O exame para avaliação da capacidade de produzirem baixas quantidades de enterotoxinas foi realizado pelo método de "ELISA". Os resultados apresentados neste trabalho indicaram que a maioria das linhagens positivas (23,63%) sintetizavam de 1 a 5ng/mL de enterotoxinas, enquanto poucas produziam de 10 a 20ng/mL. Os autores relataram ainda que algumas cepas negativas quando testadas pelo método de "ELISA" eram positivas no teste de reação emética em macacos, deveriam possivelmente ser produtoras de enterotoxinas não identificadas.

Experimento realizado com os mesmos objetivos foi levado a efeito em Campinas, São Paulo, por PEREIRA (1990) e PEREIRA *et al* (1991a) trabalhando com linhagens de *S.aureus* pauciprodutoras de "SED" não detectáveis por métodos de difusão. Os pesquisadores utilizaram as cepas FRI-396 e FRI-427 (procedentes de peixes) e FRI-464 (procedente de isolado humano) que foram inoculadas em presunto cozido e em creme de confeitaria e posteriormente, testadas em diferentes condições de cultivo. Os resultados demonstraram que "SED" foi detectada em ambos alimentos mantidos a temperaturas de 37°C, 30°C e 25°C, após 24h de incubação, em quantidades de pelo menos 1,2ng/g, levando os autores a concluir que linhagens de *S.aureus* produtoras de enterotoxinas em mínimas quantidades, quando experimentalmente inoculadas em alimentos, podem produzir quantidade suficiente de enterotoxina (ng/g) para causar intoxicação alimentar.

VALLE *et al* (1990) investigaram, na Espanha, a capacidade de produzirem toxinas de 342 isolados de estafilococos procedentes de leite e locais anatómicos de cabras sadias. A maioria das linhagens enterotoxigênicas eram pertencentes à superfície do úbere, tetas e amostras de leite. *Staphylococcus aureus* e outras nove espécies não produtoras de coagulase, identificadas como

S.chromogenes, *S.haemolyticus*, *S.warneri*, *S.epidermidis*, *S.caprae*, *S.xylosus*, *S.sciuri*, *S.saprophyticus* e *S.lentus* eram produtoras de enterotoxinas em baixas quantidades, entre 2,0 e 10,1ng/mL de "SEA", "SEB" e "SEC". Anteriormente, também na Espanha, BAUTISTA *et al* (1988), trabalhando em avaliação quantitativa da produção de enterotoxina em amostras de leite de ovelhas, já relataram a detecção de 10,4ng/mL de "SEB" sintetizada por *S.aureus*. De forma similar, estudos realizados no Japão, por FUKUDA *et al* (1984), enfatizam que 25 amostras de *S.intermedius* produtoras de "SEC" e "SEA" isoladas de cães, produziam quantidades significativamente baixas, algumas situadas em torno de 10ng/mL.

Em trabalho realizado por SU & WONG (1993), foi buscada a otimização de condições para produção de enterotoxinas estafilocócicas não identificadas. Os autores utilizaram 21 linhagens da coleção de culturas do "Food Research Institut, Madison, Wisconsin" das quais, 15 apresentaram uma produção média de 23ng/mL de "SED". Uma cultura em especial, referenciada como FRI-569, demonstrou a produção de enterotoxina ainda não identificada, uma vez que a quantidade de "SED" sabidamente produzida em níveis de 10ng/mL representa apenas 2,5% da DE₅₀ que tem valor igual a 0,5μg em 50mL, para provocar emese em macacos. E destes, cinco em seis animais, quando submetidos à administração do fluido sobrenadante com esta linhagem, apresentaram forte reação emética, o que confirmou a presença de enterotoxinas não identificadas.

Com base em recentes considerações sobre a importância de linhagens produtoras de diminutas quantidades de enterotoxinas, BERGDOLL (1995), enfatiza que, a melhor maneira de se confirmar esta premissa reside no estabelecimento da capacidade enterotoxigênica destas mesmas linhagens, em alimentos. O autor aventa também sobre a necessidade de se otimizar metodologia que promova o aumento destas quantidades. Uma vez alcançado, o "ótimo" de produção, restaria ainda o questionamento sobre qual a quantidade produzida é necessária para que uma linhagem seja considerada enterotoxigênica e, ainda, se poderiam estes resultados serem aplicados para espécies coagulase negativas.

2.5 - Produção de enterotoxinas por estafilococos não produtores de coagulase e surtos humanos

A íntima correlação existente entre a capacidade de

Staphylococcus coagular o plasma sangüíneo e de provocar doença, associada a correspondente ausência desta propriedade em linhagens não patogênicas, tem levado, há muito, à conclusões de que, a enzima coagulase desempenhe importante papel na patogênese da infecção, e que esta, portanto, represente um importante fator de virulência (BLAIR, 1962). Abrangendo, um pouco, este conceito, EVANS & NIVEN (1950) e EVANS *et al* (1950), diziam então, como resultado de observações experimentais, que linhagens enterotoxigênicas deveriam compreender todas espécies do grupo de estafilococos produtores de coagulase.

Por sua vez, a pesquisa microbiológica de alimentos conduzida para a detecção de espécies coagulase positivas, particularmente *S.aureus*, vem constituindo um preceito normativo de análise, pelo fato de que esta está mais usualmente envolvida em surtos. A enzima coagulase tornou-se assim o metabólito de escolha e permanece, até hoje, sendo o preferencial indicador de capacidade enterotoxigênica para estafilococos (CHAPMAN *et al*, 1937; HUSSEMAN & TANNER, 1949; EVANS & NIVEN, 1950; EVANS *et al*, 1950; BAER, 1966; LACHICA *et al*, 1969; PAYNE & WOOD, 1974; SANDERS, 1974; SPERBER & TATINI, 1975; RAYMAN *et al*, 1975; TATINI *et al*, 1976). Outros metabólitos como a termonuclease e lisostafina são, contudo, também utilizados. (LACHICA *et al*, 1969; VITOR *et al*, 1969; LACHICA *et al*, 1971; TATINI *et al*, 1975; DANIELSSON & HELBERG, 1977; NISKANEN & KOIRANEN, 1977; KOUHAL & DEIBEL, 1978; GARCIA *et al*, 1980; IBRAHIM & BALDOCK, 1981; BENNETT *et al*, 1986; SCHMITT *et al*, 1990).

A indústria alimentícia e os órgãos governamentais de controle e fiscalização sanitária têm rotineiramente, adotado a pesquisa de *Staphylococcus aureus* coagulase positivos devido a suposição de só os coagulase positivas produzirem uma ou mais enterotoxinas (LOTTER & GENIGEORGIS, 1975; LOTTER & GENIGEORGIS, 1977; ICMSF, 1983; APHA, 1984 e FDA, 1992).

Entretanto, dados de literatura têm mostrado, de certa forma, a existência de enterotoxinas produzidas por estafilococos coagulase negativos conforme cronologicamente se expõe a seguir:

Em 1956, THATCHER & SIMON, avaliaram comparativamente a presença das enzimas coagulase e fosfatase e a capacidade de amostras procedentes de material clínico e produtos lácteos para produzirem toxinas. Os autores identificaram uma cultura coagulase negativa, fosfatase positiva e produtora de alfa-lisina, beta-lisina e enterotoxina e outra de material clínico que se mostrou coagulase e fosfatase negativa, mas que produziu traços de alfa-lisina, e que provocou reação emética em gatos. Estes dados permitiram a observação de que os chamados indicadores de patogenicidade como, coagulase e fosfatase, não estavam diretamente correlacionados com produção enterotoxigênica.

Em 1967, em publicação no "*Bacterial Proceedings, American Society for Microbiology*", BERGDOLL e pesquisadores, efetuaram o relato de estafilococo não produtor de coagulase livre e ligada que havia produzido enterotoxina estafilocócica do tipo C. Cinco de seis macacos Rhesus administrados, via oral, com 50mL de sobrenadante de cultura, apresentaram efeitos eméticos, vindo esta pesquisa a constituir o primeiro relato a ser apresentado em congresso científico.

Em 1969, SMITH & FARKAS-HIMSLEY tentaram estabelecer a correlação existente entre 21 linhagens patogênicas de estafilococos coagulase-negativos. Segundo estes autores existia uma tendência de que, quando uma linhagem coagulase negativa era suspeita de ser o agente etiológico de uma intoxicação, se acreditasse que devia tratar-se de *S.aureus* que havia perdido caracteres de identificação ou, então, tratar-se-la de uma linhagem de *S.epidermidis*, atipicamente virulenta. Após laborioso estudo, os resultados indicaram que as cepas de estafilococos em questão caracterizavam um grupo heterogêneo e intermediário a *S.aureus* e *S.epidermidis*, fugindo portanto, do esquema dicotômico de classificação então proposto por BAIRD-PARKER (1965).

Em 1975 e 1977, LOTTER & GENIGEORGIS, buscando explicações para a enterotoxigenidade de 8 linhagens coagulase negativas procedentes de diferentes fontes, inclusive surtos, concluíram que as mesmas constituíam variedades ou mutantes de *S.aureus*, uma vez que foi possível o reisolamento de cepas coagulase positivas a partir de culturas originalmente coagulase negativas, após repetidas transferências em meios de cultivo. Os autores concluíram também que nenhum dos microrganismos testados exibiam características de *S.aureus*, *S.epidermidis* ou *S.saprophyticus*. Entretanto, ADESIYUN *et al* (1984) a respeito destas conclusões, tempos depois, questionaram a não utilização de culturas de referência no processo de identificação das linhagens teste, bem como o não emprego de técnicas sistemáticas de homologia de DNA:DNA.

Em 1977 e 1984, DANIELSON & HELBERG avaliaram a prevalência de estafilococos enterotoxigênicos em sítios anatômicos e lesões de pele de funcionários de frigoríficos. Os dados obtidos puderam evidenciar que entre 44 amostras enterotoxigênicas seis linhagens de *S.epidermidis* eram produtoras de "SEA" (três amostras) e "SEC"1" (três amostras). Segundo os autores a correlação entre prova de coagulase e potencial patogênico das linhagens conferiu ao teste uma correspondência de 82% de positividade, não fornecendo, contudo, grau de segurança absoluto.

Em 1982, o trabalho realizado na Noruega por OLSVIK e colaboradores, descreveu a produção de uma ou mais enterotoxinas A, B ou C por 12 linhagens não produtoras de coagulase. As culturas foram identificadas como *S.epidermidis* (duas amostras), *S.haemolyticus* (uma), *S.capitis* (uma) e *Micrococcus luteus* (oito).

Em 1983, HOOVER e equipe caracterizaram, através de testes bioquímicos, fisiológicos e morfológicos, diferentes cepas de estafilococos, utilizando critérios da taxonomia numérica e técnicas de hibridização de DNA:DNA. Estes autores elucidaram que a capacidade enterotoxigênica não era única e exclusiva de *S.aureus* e descreveram as culturas D143 (como, *S.hyicus* subsp. *chromogenes* - coagulase negativa, enterotoxina sorologicamente não detectada e reação emética positiva para macacos) e FRI-698M (que aparentemente perdeu algumas das características iniciais da cultura estoque FRI-698, após longo período de estocagem e desidratação). Esta cultura FRI-698M apresentou-se como coagulase negativa e produtora de enterotoxina D e foi classificada como uma variante atípica de *S.epidermidis*.

Em 1983, ADESIYUN & USMAN realizaram um estudo no Zaire, Nigéria, acerca da enterotoxigenidade de cepas isoladas a partir de sítios anatômicos de cães domésticos, observando que 15% de culturas de estafilococos coagulase negativos, em ensaios realizados com plasma humano, e 6,9%, em ensaios com plasma de canídeos, se apresentaram como produtoras de enterotoxinas.

Em 1984, estudo mais pormenorizado da produção de enterotoxina estafilocócica por *S.hyicus* foi realizado por ADESIYUN *et al.* Testaram-se, entre outros, homologia de DNA:DNA, a produção das enterotoxinas identificadas (de A a E) e capacidade de produção de coagulase. Para tal, foram empregadas cinco estirpes de *S.hyicus* (três sub-espécies *hyicus* e duas sub-espécies *chromogenes*) procedentes de sítios anatômicos de suínos e aves domésticas saudáveis e lesões de bovinos. Estudo paralelo foi conduzido com linhagens padrão de *S.aureus* ATCC 12600, *S.epidermidis* ATCC 14990 e *S.saprophyticus* ATCC 15305. Os resultados obtidos permitiram a observação de que todas cinco linhagens testadas produziram resposta de reação emética, quando da administração intragástrica de seus filtrados em macacos, embora níveis detectáveis de enterotoxina não tenham sido verificados no ensaio de imunomicrodifusão em lâmina. Foram ainda evidenciadas duas linhagens, VII 76 e VII 131, de *S.hyicus* como coagulase variáveis em ensaios realizados com plasma de coelho e suíno, enquanto as linhagens VA 519, VA 518 e B 04, respectivamente de *S.hyicus*, *S.chromogenes* e *S.chromogenes* mostraram resultados negativos para presença da enzima coagulase, em ambos ensaios, ficando

genericamente inferida a possibilidade de linhagens enterotoxigênicas não produtoras de coagulase serem ignoradas, quando da análise de alimentos implicados em surtos (ADESIYUN *et al*, 1984).

Em 1984, FUKUDA *et al*, reportaram que 24% de 210 linhagens de *S.intermedius* (coagulase negativos e "TNase" positivos) oriundas de cães produziam uma ou mais enterotoxinas A, B ou C.

Em 1986, CRASS & BERGDOLL, também descreveram a produção de enterotoxinas por estafilococos, procedentes de pacientes com síndrome de choque tóxico e infecção estafilocócica e de alimentos implicados em surtos. Algumas linhagens produziam concomitantemente "SEA" e "SEC" e a toxina "TSST"-1.

Em 1986 e 1988, experimentos realizados por BAUTISTA *et al*, com um total de 124 linhagens de estafilococos procedentes de leite de ovelhas, foi relatado na Espanha. Amostras de leite coletadas diretamente em fazendas, em diferentes estações do ano, foram analisadas e demonstraram 78 culturas enterotoxigênicas. Destas, 13 eram compatíveis a espécies coagulase negativas (uma de *S.cohnii*, três de *S.epidermidis*, quatro de *S.xylosus* e cinco de *S.haemolyticus*).

Em 1990, em trabalho realizado também na Espanha, VALLE *et al* avaliaram a produção de enterotoxina por estafilococos isolados a partir de amostras de leite e sítios anatômicos de cabras saudáveis. Os resultados apresentados evidenciaram amostras coagulase negativas tendo *S.chromogenes*, *S.warneri*, *S.sciuri*, *S.saprophyticus* e *S.lentus*, na ocasião, seu primeiro registro como espécies produtoras de enterotoxina.

Em 1992, NANU & NARAYAN, pesquisando estafilococos em produtos cárneos e indústrias de processamento na Índia, relataram também a capacidade enterotoxigênica de seis culturas não produtoras de coagulase e MARÍN *et al* (1992), trabalhando com amostras de presunto, em Madri, observaram a presença de uma amostra de *S.epidermidis* produtora de "SEC".

Em 1995, no Brasil, OLIVEIRA, detectou em leite bovino "in-natura", proveniente da região de Campinas, São Paulo, amostras de estafilococos enterotoxigênicos não produtores de coagulase. Em 1996, também no Brasil, em Londrina, Paraná, e Belo Horizonte, Minas Gerais, a partir de portadores humanos, foi igualmente relatada a presença de amostras com o mesmo perfil (OLIVEIRA *et al*, 1995; PEREIRA *et al*, 1995 e 1996a).

Praticamente, inexistem estudos sobre o crescimento de estafilococos coagulase negativos em alimentos e uma possível razão da quase não evidência destes em pesquisas de alimentos envolvidos em surtos poderia ser relacionado com a incapacidade ou inabilidade de seu crescimento em substratos alimentícios. Entretanto, deve-se considerar que, sabidamente, espécies coagulase negativas poderiam, potencialmente, alcançar alimentos uma vez que, tanto homem como animais são portadores usuais destas estirpes (BERGDOLL, 1995). Cabe ressaltar ainda que, mesmo considerando que *S.aureus* retenha estatisticamente a máxima participação em surtos, os relatos de produção de enterotoxinas por espécies coagulase negativas, ora comentados, conferem a estas importância que não deve ser negligenciada e, efetivamente, carecem maiores estudos.

O primeiro relato de um surto de intoxicação alimentar provocado por estafilococos coagulase negativos ocorreu em Osaka, Japão. Conforme publicação de OMORI & KATO (1959), 40 estudantes de uma escola secundária estiveram envolvidos. A pesquisa para averiguação da capacidade enterotoxigênica das linhagens (obtidas a partir de fezes de pacientes e de pratos utilizados no lanche do hotel), foi procedida em gatos jovens e o efeito emético foi observado nestes, após 30 minutos da ingestão.

O segundo e último relato foi, de forma detalhada, notificado por BRECKINRIDGE & BERGDOLL (1971). O episódio de gastroenterite aguda, foi desencadeado, em outubro de 1969, nos Estados Unidos, quando 264 pessoas participaram de um banquete. Um total de 223 comensais foram entrevistados e destes 145 manifestaram a doença. O período de incubação variou de 1h30min a 8h. Os sintomas apresentados pelos acometidos foram típicos de intoxicação estafilocócica e caracterizaram-se por náusea e vômito (em 63% dos acometidos), diarreia (em 79%) e dores abdominais (em 20%). Carne e arroz foram apontados como os alimentos que apresentaram maior razão de ataque, tendo sido detectado e identificado *Staphylococcus epidermidis* não produtor de coagulase, como produtor de "SEA", na carne consumida e também em lesões secas de impetigo presentes nas mãos de um manipulador. Culturas concentradas de *Staphylococcus epidermidis* obtido de ambas procedências foram testadas para reação emética em macacos e resultaram positivas para produção de vômito nos animais, após decorrido o tempo de 2-3h da ingestão, caracterizando-se, desta forma, o primeiro registro no "Food Research Institut", Madison, Wisconsin de detecção de enterotoxina sintetizada a partir de *S.epidermidis*, espécie coagulase negativa.

2.6 - Enterotoxinas estafilocócicas

Historicamente, foi a partir dos episódios ocorridos em Michigan e Ilhas Filipinas que se fomentaram os primeiros relatos de surtos estafilocócicos. Os estudos então elaborados citavam o envolvimento de queijo e leite materno sendo que, neste último alimento, "toxina formada por estafilococo branco, não produtor de pigmento" havia sido detectada e descrita como o agente tóxico (ROSENBACH, 1884 *apud* BERGDOLL, 1989 e BARBER, 1914).

A primeira evidência, contudo, de associação de um "filtrado estéril de estafilococos" com os sintomas de vômito e diarreia em um surto de gastroenterite em Chicago, foi reportado por DACK (1930) *apud* BAIRD-PARKER (1990) e MOSSEL & VAN NETTEN (1990). Os envolvidos ingeriram bolo de Natal, cujo recheio se encontrava contaminado com o microrganismo. Voluntários humanos e gatos jovens foram utilizados em estudo experimental que estabeleceu, pioneiramente, a ligação entre enterotoxigenidade do alimento ingerido e os organismos isolados a partir deste alimento.

Progresso, no sentido da identificação deste agente tóxico, foi alcançado através de exaustivas pesquisas conduzidas pelo "Food Research Institut", Madison, Wisconsin, quando a ocorrência de mais de um tipo imunológico desta substância, já havia sido verificada por SURGALLA *et al* (1953) e THATCHER & MATHESON (1955). Entretanto, o avanço das pesquisas culminou por ocasião da identificação da proteína enterotóxica procedente de *S.aureus* 56 (BERGDOLL *et al*, 1959) e de *S.aureus* FRI-196E para a qual CASMAN (1960) identificou anticorpos específicos.

CASMAN *et al* (1963) elaboraram um estudo de nomenclatura com base nos princípios de antigenicidade destas substâncias e estabeleceram critérios de designação alfabética, cabendo à toxina produzida pela cepa FRI-196E (CASMAN, 1960), a denominação de "enterotoxina A", pela importância desta estar mais diretamente relacionada a surtos alimentares e, de "enterotoxina B", a primeira, aquela identificada por BERGDOLL *et al* (1959). Posteriormente, foram identificadas "SEC" e "SED" (BERGDOLL *et al*, 1965; CASMAN *et al*, 1967) e, nos anos 70, BERGDOLL *et al* (1971) identificaram "SEE". A próxima identificação recaiu sobre "TSST"-1 (que se postaria na posição F) a qual, foi associada à síndrome do choque tóxico por SCHLIEVERT *et al* (1981), e, embora não estando relacionada à intoxicação alimentar, apresenta características imunológicas e físico-químicas muito similares a estas.

A enterotoxina G por sua vez, não teve por ocasião de sua descoberta e identificação, divulgação científica e, por não ter sido purificada, teve, somente depois, seu gene *seg+*, seqüenciado por MUNSON & BETLEY (1991). Finalmente, em meados de 1995, por SU & WONG, é finalmente relatada a identificação e purificação de "SEH".

Entretanto, até o momento, de acordo com BERGDOLL (comunicação pessoal), ainda permanecem desconhecidas cerca de 5% de enterotoxinas que, não se agrupam imunologicamente às mencionadas embora sejam, reconhecidamente, aptas para provocar emese em macacos, conforme previamente observado em estudos com *S.hyicus* isolados a partir de animais (HOOVER *et al*, 1983), fato este, também, já, abordado por SU & WONG (1993 e 1995), que, trabalharam com a linhagem FRI-569 produtora de "SE" não identificada.

2.6.1 - Características físico-químicas, comportamento imunológico e determinantes genéticos de produção

Uma vez identificadas, "SEA", "SEB", "SEC", "TSST"-1, "SED" e "SEH" foram purificadas e seqüenciadas, sendo caracterizadas do ponto de vista físico-químico, observando-se a discriminação de "SEC" em "SEC"1, "SEC"2 e "SEC"3 (BERGDOLL *et al*, 1959; CHU *et al*, 1966; BORJA & BERGDOLL, 1967; AVENA & BERGDOLL, 1967; CHANG & BERGDOLL, 1969; BORJA *et al*, 1972; REISER *et al*, 1984; REN *et al*, 1993 *apud* BATHI *et al*, 1994; SU & WONG, 1995).

De acordo com BERGDOLL & ROBBINS (1973), HALPIN-DOHNALEK & MARTH (1989), VARADARAJ & RANGANATHAN (1989), BERGDOLL (1989); BERGDOLL (1990a) e SU & WONG (1995) as características físico-químicas das enterotoxinas estafilocócicas apresentam similaridades entre si, que podem assim ser resumidas: constituem proteínas simples de peso molecular situado entre 26.000 a 29.000 e estruturadas em uma única cadeia polipeptídica rica em lisina, tirosina e ácidos aspártico e glutâmico. Possuem dois resíduos de cisteína, que formam alças por intermédio de pontes de dissulfeto, característica esta que se observa em todas enterotoxinas. No estado ativo, as enterotoxinas resistem à ação de enzimas proteolíticas como pepsina, tripsina, quimiotripsina, papaína e renina.

As enterotoxinas estafilocócicas apresentam também a propriedade de

termoresistência, conforme postulado por JORDAN *et al* (1931), que observaram emese em macacos, que haviam sido administrados com filtrados estéreis de *S.aureus*, após fervura por 30 minutos. Esta propriedade vem constituir ponto crucial em controle de qualidade de alimentos, uma vez que a enterotoxina pode persistir no produto final, após o processamento térmico. Segundo HUMBER *et al* (1975), a perda da atividade biológica de "SE", pelo aquecimento, parece ocorrer antes da perda da atividade imunológica, sendo que a toxicidade diminui paulatinamente com a autoclavagem ou ebulição conforme observado para "SEA", quando aquecida a 100°C (DENNY *et al*, 1966).

Estruturalmente, o sítio de toxicidade da molécula proteica parece estar relacionado com a sequência de aminoácidos que, envolve dois resíduos de cisteína, que formam uma alça de cistina através de pontes de dissulfeto (BERGDOLL & ROBBINS, 1973). As pesquisas sobre a topologia de funções na molécula de "SEA", conduzidos por NOSKOVA *et al* (1984) apresentaram resultados compatíveis aos estudos de SPERO *et al* (1973 e 1976), para "SEB" e "SEC", respectivamente, quando estes autores relataram que o polipeptídeo N-terminal da molécula de "SEC"1 retém a alça de cistina a qual, segrega o efeito toxigênico da molécula. Por sua vez, a ruptura desta alça na "SEB", implicaria na perda da atividade enterotóxica. Segundo NOSKOVA *et al* (1984), esta teoria poderia ser aplicada à todo grupo de "SE", sendo que a manutenção da estrutura secundária, na área da alça de cistina se faz necessária para a obtenção dos efeitos enterotóxicos. Diferencia-se destas, a toxina "TSST"-1, apenas por apresentar um único resíduo de cisteína (BERGDOLL *et al*, 1989).

Por sua vez, o sítio antigênico ocorre na outra lateral da alça e define os tipos imunológicos de A a H. A sequência de aminoácidos, nesta área, de acordo com estudos efetuados com "SEA" e "SEB", demonstra não ser a mesma. Pode-se entender que, ao longo do processo evolutivo, a cadeia proteica tenha sofrido substituições nos resíduos de aminoácidos, o que conferiu à molécula características imunológicas diferenciadas, mas manteve inalterado o sítio envolvido com a propriedade tóxica (BERGDOLL & ROBBINS, 1973).

Conforme estabelecido por CASMAN *et al* (1963), ainda hoje as características imunológicas das enterotoxinas estafilocócicas permitem a designação de "SEA" a "SEH", através de suas reações com anticorpos específicos, sendo que "SEC"1 e "SEC"2 apresentam reações homólogas aos mesmos anticorpos (BERGDOLL, 1989). Reações cruzadas são comumente observadas entre as outras enterotoxinas e isto foi evidenciado a partir do fato de que antitoxinas preparados contra "SEB" reagiram efetivamente com o grupo "SEC" (LEE *et al*, 1980). Assim, "SEB" e "SEC" apresentam relação de similaridade antigênica, diferenciando-se do grupo "SEA" e "SEE" (BAYLES & IANDOLO, 1989).

Os mecanismos genéticos envolvidos na síntese das enterotoxinas permanecem ainda não totalmente elucidados (IANDOLO, 1989). Entretanto, alguns trabalhos têm demonstrado que "SEA" é codificada pelo elemento *entA*, localizado no cromossoma entre os marcadores *pur-110* e *liv-129*, conservando contudo estrutura interna através de um mapeamento indefinido nas áreas cromossômicas (SHAFFER & IANDOLO, 1978; PATEE & GLATZ, 1980; MALLONEE *et al*, 1982; BETLEY *et al*, 1984), embora BETLEY & MEKALANOS (1985) tenham aventado a hipótese da codificação por fagos temperados.

Pesquisas sobre os determinantes genéticos de produção de "SEB" enfatizam a instabilidade estrutural do gene *entB* (RANELLI *et al*, 1985) e segundo DYER & IANDOLO (1981), a expressão genética desta, ocorreria conjuntamente de forma plasmidial e cromossômica. Já BETLEY & BERGDOLL (1981), reportaram que o gene *entC*, implicado na produção de "SEC" é de origem cromossômica, o que foi, também relatado conforme *seg+* detectado a partir de *S. aureus* MJB801, produtor de "SEG" (MUNSON & BETLEY, 1991; BETLEY *et al*, 1992. Segundo IANDOLO (1989), a presença de sítios cromossômicos, plasmidiais e bacteriófágicos que aloca os genes da expressão enterotóxica representa a configuração básica do genoma de estafilococos.

2.6.2 - Atividades biológicas e mecanismo de ação farmacológica

Cerca de 34 diferentes tipos de proteínas extracelulares podem ser produzidas por estafilococos e muitas delas estão envolvidas ou contribuem para o processo de patogenicidade e virulência do microrganismo (IANDOLO, 1989). Entre estas, as enterotoxinas, quando previamente sintetizadas em alimentos, caracterizam o agente causal da intoxicação estafilocócica, que vem merecendo, por parte de pesquisadores, acurados estudos e vasta cobertura científica (ANGELOTTI, 1969; MINOR & MARTH, 1972; BERGDOLL, 1979; TODD, 1983; DAVEY, 1985; TODD, 1985; CLIVER, 1987; VEIT, 1987; BRYAN, 1988; WHELOCK, 1988; BERGDOLL, 1989; GENIGEORGIS, 1989; TODD, 1989; BERGDOLL, 1990a; TRANTER, 1990; ALKANAHIL & GASIM, 1993).

O quadro clínico observado na intoxicação estafilocócica tem suas principais características estabelecidas no vômito e diarreia. Náusea, calafrios, dores abdominais e prostração ocorrem usualmente e o estado febril é de rara ocorrência. Os sintomas clínicos se manifestam após um curto período de incubação (em média 4 horas), apresentando durabilidade fugaz, com caráter geralmente não fatal,

retratada por uma fase aguda de início abrupto mas, auto-limitada e com restabelecimento do doente observado em torno de 24 a 72 horas (BERGDOLL, 1990a). A absorção da enterotoxina é promovida pela mucosa gastrointestinal, aproximadamente 15 minutos após a ingestão, e sua excreção ocorre após 3 horas de exposição no organismo (BEERY *et al*, 1984).

A dose tóxica mínima, em experimentos conduzidos com voluntários humanos, utilizando-se isoladamente enterotoxina purificada do tipo A, B e C, foi relatada como sendo de 0,05µg/kg (3,5µg/homem de 70kg), dose esta suficiente para provocar vômito e diarreia (BERGDOLL, 1989). Por sua vez, resultados de avaliação de alimentos implicados em surtos revelaram que quantidade de 0,125-0,250µg de "SE" por 100g de alimento poderia provocar sintomas (REISER *et al* 1974). Entretanto, foi em 1985, que, através de detalhada descrição de surto ocorrido em uma escola, nos Estados Unidos, EVENSON *et al* (1988) propiciaram uma melhor estimativa sobre a real quantidade de "SE" necessária para ocasionar a doença em indivíduos sensíveis. Neste episódio, 87 (31,5%) de 276 crianças apresentaram sintomas de intoxicação estafilocócica, após a ingestão de leite achocolatado que continha 0,4-0,7ng/mL o que permitiu o estabelecimento de 100 a 200ng de "SEA" como sendo a dose tóxica.

Segundo BERGDOLL (1983) *apud* PEREIRA (1990), a sintomatologia das intoxicações estafilocócicas é bem conhecida, porém o seu modo de ação no homem não se encontra devidamente estabelecido, visto que a doença por não ser fatal usualmente impede a avaliação anatomopatológica de seus efeitos. Todavia, a autopsia de duas crianças, que morreram vítimas da ingestão de leite materno de cabra, conforme relatado por WEED *et al* (1943), ofereceu oportunidade única para se observar os efeitos patológicos de "SE", que, se caracterizaram por edema pulmonar com algumas áreas hemorrágicas no interior dos alvéolos e infiltração de leucócitos no fígado (BERGDOLL, 1989).

A reação de vômito é decorrente da estimulação de receptores eméticos localizados no estômago e intestino, que é transmitida então, via vago e nervos simpáticos, até o centro do vômito. Por sua vez, a estimulação diarreica, considerada o segundo mais comum sintoma da intoxicação estafilocócica, tem o seu mecanismo ainda não elucidado. Sabe-se que "SE" não responde à maneira das toxinas envolvidas com as diarreias clássicas, as quais têm como característica provocar acúmulo de fluidos em teste de alça ligada em coelhos (BERGDOLL, 1989).

HUMPHREYS *et al* (1989) reportaram que uma elevada proporção de *S.aureus*, isolados a partir de pacientes com septicemia, produziam enterotoxinas e ARBUTHNOTT *et al* (1990), consideraram a hipótese de que estas poderiam gerar

efeitos sistêmicos, em adição ao vômito e diarreia. Há ainda a se relatar os efeitos mitogênicos e de imunossupressão, aos quais as enterotoxinas estafilocócicas vêm sendo associadas (SMITH & JOHNSON, 1975; LANGFORD *et al*, 1978; BUXER *et al*, 1981; DOHLSTEN *et al*, 1991).

2.6.3 - Fatores que influenciam a produção de enterotoxinas

Vários tipos de alimentos já foram epidemiologicamente incriminados e são, frequentemente, relatados como capazes de suportar o desenvolvimento natural e artificial de estafilococos, sobretudo *S. aureus*, bem como a produção de suas enterotoxinas. Dentre os principais substratos alimentícios, de acordo com dados oriundos de diferentes países, inclusive o Brasil, podem ser destacados produtos lácteos (queijos, leite cru, pasteurizado e em pó, manteiga e sorvetes), produtos de confeitaria (tortas, bolos recheados e doces cremosos), carnes frescas e curadas, ovos e massas alimentícias (GEIGER *et al*, 1935; HACKER, 1939; CAUDIL & MEYER, 1943; ANDERSON & STONE, 1955; ARMIJO *et al*, 1957; HENDRICKS *et al*, 1959; THATCHER *et al*, 1959; ALLEN & STOVAL, 1960; CASMAN *et al*, 1963; HOBBS, 1964; McCOY & FABER, 1966; DONNELLY *et al*, 1967; DONNELLY *et al*, 1968; McLEAN *et al*, 1968; PIVNICK *et al*, 1968; ZEHREN & ZEHREN, 1968; GENIGEORGIS *et al*, 1969; BARBER & DEIBEL, 1972; SCHEUSNER & HARMON, 1973; SHEIKH & LUEDECKE, 1974; DELAZARI & LEITÃO, 1976; CDC, 1977; WILSON, 1977; DELAZARI *et al*, 1978; HARBRECHT & BERGDOLL, 1980; IARIA, 1981; SANTOS & GENIGEORGIS, 1981; STEELE & STILES, 1981; WYATT & GUY, 1981; HIROOKA & MULLER, 1982; MANDIL *et al*, 1982; AHMED *et al*, 1983; CDC, 1983ab; MANSFIELD *et al*, 1983; SANKARAN & LEELA, 1983; KARINO *et al*, 1985; CDC, 1986; HIROOKA *et al*, 1987; NOLETO & TIBANA, 1987; EVENSON *et al*, 1988; SABIONI *et al*, 1988; BERGDOLL, 1989; GELLI *et al*, 1989; CARMO & BERGDOLL, 1990; PEREIRA *et al*, 1990; PEREIRA *et al*, 1991ab; MATHIEU *et al*, 1991; ADESIYUN *et al*, 1992; ANUNCIAÇÃO, 1992; ISIGIDI *et al*, 1992; NANU & NARAYAN, 1992; UNTERMAN & MÜLLER, 1992; MASUD *et al*, 1993; OTERO *et al*, 1993; AYULO *et al*, 1994; OLIVEIRA, 1995; PORTO & SILVA, 1995).

Existem, contudo, fatores que são capazes de interferir na multiplicação de estafilococos e a quase totalidade de trabalhos que abordam esta temática encontra-se dirigida especialmente a *S. aureus*. BAIRD-PARKER (1971), MINOR & MARTH (1972), TATINI (1973), SMITH *et al* (1983), ZAYATZ & LEDFORD (1985), GENIGEORGIS (1989) e HALPIN-DOHNALEK & MARTH (1989) relataram que necessidades nutricionais, pH,

temperatura, atividade de água, condições atmosféricas, concentração de NaCl, injúria celular e crescimento associado à outros microrganismos, constituem fatores que, de forma inteirada, irão determinar o crescimento de *S. aureus* em substratos alimentícios e condicionar a produção de suas enterotoxinas, principalmente "SEB", que é altamente dependente de fatores físicos e químicos.

O desenvolvimento de meios de cultura, objetivando a otimização da produção de enterotoxinas, tem sido relatado com frequência e o emprego de substratos como, pó de hidrolisado proteico (PHP) e hidrolisado pancreático de caseína ("Nz-amine A", da Sheffield Products, Norwich, NY), que enriquecidos com complementos vitamínicos, usualmente tiamina e niacina, em diferentes concentrações, caracterizam o cultivo de excelência para a produção de "SE", em larga escala (SURGALLA *et al*, 1951; DACK, 1963; KATO *et al*, 1966; REISER & WEISS, 1969; METZGER *et al*, 1973; VANDENBOCSH *et al*, 1973; PEREIRA *et al*, 1982 e SU & WONG, 1993). ROBBINS *et al* (1984), MELCONIAN *et al* (1983) e LOPES *et al* (1991) observaram contudo que, os caldos de infusão de cérebro e coração e tripticaseína de soja vitamínicamente suplementados, oferecem boas condições para a síntese de enterotoxinas, eliminando com isto as dificuldades de acesso comercial ao meio "Nz-Amine A".

2.7 - Métodos analíticos para averiguação e detecção de enterotoxinas estafilocócicas

2.7.1 - Bioensaios

Os animais mais comumente utilizados para o diagnóstico de "SE", são, entre outros, gatos (filhotes e adultos), administrados por via intraperitoneal ou intravenosa e macacos Rhesus (*Macaca mullata*), administrados via oral. O teste com gatos foi proposto e estudado por DOLMAN *et al* (1940) e HAMMON (1941) que injetavam aproximadamente 2mL de toxina filtrada e tratada com formaldeído. Anteriormente, BARBER (1914) e JORDAN *et al* (1931), já haviam reportado a utilização de macacos.

SURGALLA *et al* (1953) propuseram a concentração da amostra teste no sentido da obtenção de uma melhor resposta no teste de emese em macacos Rhesus. Assim, a administração de extratos concentrados em até 20 vezes o volume inicial da cultura, em porções aproximadas de 50mL, vem constituindo a dose recomendada e que é aplicada a cada três grupos de seis animais. O teste de reação emética em macacos permanece, até o presente momento, como metodologia comprobatória para enterotoxinas desconhecidas e não caracterizadas, conforme utilizado por HOOVER *et al* (1983), KOKAN & BERGDOLL (1987) e SU & WONG (1993) considerando-se como enterotoxinas estafilocócicas todas substâncias que, uma vez intragastricamente administradas, determinam reação emética nestes animais (SURGALLA *et al*, 1953).

Em 1993, CAFARCHIA *et al*, propuseram a utilização da forma larvar de *Artemia salina* com vistas à determinação de enterotoxicidade de *S. aureus*. Neste bioensaio, o grau de toxicidade é diretamente relacionado à percentagem de morte larvar, tendo, paralelamente, sido a produção de enterotoxina avaliada por "RPLA".

Permanece, contudo, até os dias atuais, sendo a resposta emética apresentada por macacos Rhesus a mais próxima daquela que ocorre no homem. Estes animais, não apresentam as interferências observadas com gatinhos e larvas os quais, estão sujeitos a reações não específicas. As dificuldades referentes ao emprego de macacos estão relacionadas com custos de manutenção e, principalmente, com a perda de sensibilidade decorrente do desenvolvimento de anticorpos específicos após sucessivas administrações (DAVISON *et al*, 1933; DACK, 1963; MINOR & MARTH, 1972).

2.7.2 - Métodos imunológicos tradicionais

A partir dos estudos de DAVISON *et al* (1933), é que se confirmaram os princípios de antigenicidade das enterotoxinas estafilocócicas. Como estas substâncias são proteínas simples, não passíveis portanto de detecção por métodos químicos, as técnicas de detecção passaram a se fundamentar no uso de anticorpos especificamente preparados.

As reações de precipitação em ágar ou agarose conforme proposições de OUCHTERLONY (1949), OUDIN (1952) e OUCHTERLONY (1953) alicerçam os princípios imunológicos do método que foi paulatinamente, desenvolvido e melhorado.

Estes testes, fundamentam-se na capacidade do antígeno (enterotoxina) interagir com anticorpos policlonais específicos e de título próprio, permitindo a formação de um precipitado que se denomina precipitina. A união do antígeno-anticorpo, incorporados em uma placa de ágar ou agarose, determinará o aparecimento do precipitado, que se mostra como uma banda ou linha branca, de fácil leitura e observação, sendo que a distância percorrida por esta união é diretamente proporcional à quantidade de antígeno presente na amostra teste. Quando os dois componentes são dispostos, separadamente, no suporte de ágar ou agarose e se ambos se difundem um em direção ao outro, a técnica é denominada imunodifusão dupla. Por outro lado, quando só o antígeno se movimenta em direção ao anticorpo fixo, o método é denominado de imunodifusão simples (MINOR & MARTH, 1972; VARADARAJ & RANGANATHAN, 1989; BERGDOLL, 1990).

CASMAN *et al* (1969), a partir da miniaturização do procedimento estabelecido por CROWLE (1958), no qual pequenas quantidades de reagentes utilizados conferem sensibilidade e velocidade à reação, uniformizaram o procedimento imunológico denominado "micro-slide gel double diffusion test" (micro imunodifusão em lâmina), que apresenta nível de detecção que se estende até 0,1 µg/mL. Esta técnica, permite evidenciar a presença de "SE" diretamente da amostra testada, entretanto, apresenta as desvantagens de exigir uma prévia separação dos constituintes solúveis e insolúveis e, finalmente, cuidadosa concentração da amostra. Isto aumenta muito o tempo de análise e requer pessoal especialmente capacitado para a execução (BENNETT & McCLURE, 1976).

Por sua vez, a metodologia denominada "Optimun Sensitivity Plate - OSP" (Sensibilidade Ótima em Placa), proposta por ROBBINS *et al* (1974), foi considerada adequadamente sensível para a avaliação de linhagens enterotoxigênicas. Este método é efetuado de forma associada com técnicas selecionadas de produção de enterotoxinas, quer seja em membrana de diálise sobre ágar (HALLANDER, 1965; JARVIS & LAWRENCE, 1970), quer em saco de diálise (DONNELLY *et al*, 1967). Atinge níveis de detecção próximos a 0,5 µg/g de enterotoxina na cultura, sendo que, quando há concentração do fluido sobrenadante, este limite é estendido à 0,1 µg/mL (ROBBINS *et al*, 1974).

Outros modelos de procedimento analítico já foram descritos como a difusão em tubo capilar (descrito por FUNG & WAGNER, 1971), teste quantitativo de precipitina (utilizado por SILVERMAN, 1963), teste de eletroimunodifusão-imunoosmoforese (proposto por LAURELL, 1966) e ainda o "RIO" - Imunoosmoforese reversa (descrito por KIMBLE & ANDERSON, 1973) entretanto, recai sobretudo ao "OSP" (ROBBINS *et al*, 1974), o maior nível de aceitação, quer seja pelos resultados oferecidos, quer pela aplicabilidade e facilidade de manuseio.

2.7.3 - Métodos imunológicos finos

Considerando que um número bastante significativo de linhagens enterotoxigênicas sintetizam quantidades de "SE" muitas vezes inferiores a 1ng/mL, as enterotoxinas não seriam, portanto, alcançadas pelos métodos de imunodifusão anteriormente comentados e, ainda assim, seriam capazes de provocar intoxicação alimentar (IGARASHI *et al*, 1986; EVENSON *et al*, 1988; KOKAN & BERGDOLL, 1987).

Este fato, foi claramente evidenciado a partir dos questionamentos que passaram a existir a respeito da eficácia do método de imunodifusão "OSP", quando isolados de *S.aureus*, procedentes de alimentos implicados em surtos, se apresentaram negativos para a produção de enterotoxinas muito embora se comportassem de forma positiva no teste de reação emética em macacos (KOKAN & BERGDOLL, 1987).

Assim, procedimentos que possam ser diretamente aplicados aos extratos de alimentos, permitindo níveis de detecção abaixo de 1µg/mL (próximo a 0,1-1,5ng/mL) e portanto, de maior acuidade que o método de imunodifusão em lâmina vêm caracterizar o perfil de métodos de maior abrangência que se compatibilizam com as linhagens produtoras de "SE" em quantidades diminutas, permitindo concomitantemente, entre outras vantagens, a obtenção de resultados em tempo mais ágil.

Técnicas de hemaglutinação, utilizando eritrócitos de carneiros já foram descritas. De acordo com a proposição de JOHNSON *et al* (1967), os eritrócitos, uma vez que não possuem sítios receptores para a molécula de "SE", são formaldeizados, recobertos com ácido tânico e sensibilizados com enterotoxina. Na presença de específicos anticorpos, os eritrócitos irão sofrer aglutinação. Neste caso, os eritrócitos funcionam como meros carreadores do antígeno, caracterizando a hemaglutinação indireta ou passiva ("PHA"). Baixas concentrações de "SEB", a partir de fluidos sobrenadantes, foram detectadas por este método.

Já na hemaglutinação reversa passiva ("Reversed passive hemagglutination assay, RPHA"), demonstrada por SILVERMAN *et al* (1968), os eritrócitos tratados com ácido tânico são sensibilizados com moléculas de antitoxina e preservados com formaldeído ou aldeído pirúvico para posterior captação direta da enterotoxina confida na amostra teste. Concentrações de até 0,007µg de "SE" foram encontradas por estes autores, com o uso deste procedimento.

Aperfeiçoamento desta técnica foi sugerida por YAMADA *et al* (1977),

que utilizaram imunoglobulinas anti A, B, C, D e E, sorofracionadas por cromatografia de afinidade, o que proporcionou uma significativa redução de reações inespecíficas com os componentes dos alimentos testados. Detecção de 0,01µg/mL de "SE", sem concentração da amostra, foi observada em um reduzido período de 3 horas.

Outra variação deste método foi estabelecida por SALOMON & TEW (1968), que consideraram os problemas apresentados pelas técnicas de hemaglutinação e os relacionaram, sobretudo, à preparação, padronização e estabilidade dos reagentes. Desta forma, os autores sugeriram a substituição de eritrócitos por partículas de látex de poliestireno, que seriam sensibilizadas com a antitoxina específica, caracterizando a aglutinação reversa passiva em látex ("Reversed passive latex agglutination, RPLA"). O método foi considerado simples e sensível, entretanto mostrou-se pouco específico, porque as partículas de látex foram sensibilizadas com antitoxina não purificada. De acordo com ODA *et al* (1979) *apud* FUJIKAWA & IGARASHI (1988), este problema foi prontamente solucionado com a utilização de antígenos purificados.

PARK & SZABO (1986) avaliaram quatro lotes do conjunto de reagentes do "SET-RPLA" (Denka Seiken Co. Ltd. Tokyo), com vistas à eficácia do procedimento. Os autores observaram elevada especificidade e sensibilidade, confirmada pelo menor limite observado, equivalente a 0,75ng/g de "SE" (A, B, C) detectadas em carne cozida de vaca e peru, presunto e queijo. Os procedimentos de extração e concentração das amostras foram simples e os resultados fornecidos em um período de 24 horas.

De maneira similar, ROSE *et al* (1989) avaliaram amostras de diferentes produtos lácteos e obtiveram também com o sistema "SET-RPLA" níveis de detecção estabelecidos em 0,25ng/g de "SE". Os autores relataram ainda que reações não específicas só ocorreram com os produtos que foram manufaturados com renina e que estas reações puderam ser minimizadas pela adição de 10mM de hexametáfosfato de sódio ao próprio diluente fornecido pelo sistema. IGARASHI *et al* (1986) relataram como sendo de 1,0ng/mL de "TSST"-1 o menor índice de detecção e, em extratos de produtos à base de peixes, SANJEEV & SURENDRAN (1992) obtiveram, em 24 horas, resultados para "SE" (A, B, C, D) situados entre 0,30-0,60ng/g.

FUJIKAWA & IGARASHI (1988) aperfeiçoaram o método "RPLA" através do uso de partículas de látex de alta densidade ("Immutex", 1,5g/cm³ e 1,29µm), tendo em vista sobretudo a redução do tempo de realização do ensaio (Rápido "RPLA"). Análise comparativa entre as duas técnicas demonstrou elevada sensibilidade e especificidade atingindo níveis de 0,5ng/mL de "SE", obtidos tanto para fluidos

sobrenadantes de culturas como para alimentos. O tempo de incubação por sua vez, foi reduzido de 16 para 3 horas. Uma outra alteração proposta para a redução de tempo de incubação foi proposta por BANKES & ROSE (1989) que obtiveram, resultados em 4 horas, implementando o procedimento com a centrifugação prévia de 10g da amostra durante 90 minutos.

Um outro método rápido e bastante sensível é o radioimunoensaio ("RIA - Radioimmunoassay") e, sua aplicabilidade para detecção de enterotoxinas em alimentos foi relatado por BERGDOLL & REISER (1980). Este procedimento foi primeiramente aplicado por JOHNSON *et al* (1971) e COLLINS *et al* (1972), que obtiveram índices de detecção situados entre 1 a 10ng/mL. O princípio que norteia este procedimento está baseado na relação entre a enterotoxina não marcada e contida na amostra teste e a enterotoxina marcada com I^{125} , que irá competir pelo mesmo sítio de ligação localizado no anticorpo adsorvido em um suporte inerte. O tipo de suporte, bem como o modelo configurativo do ensaio, podem ser variáveis, conforme relatado por MILLER *et al* (1978). Este método apresenta contudo, o sério inconveniente da utilização de material radioativo, o que gera riscos aos técnicos envolvidos e ao meio ambiente, e, ainda, requer infraestrutura e equipamentos de custo operacional elevado (THOMPSON *et al*, 1988; BERGDOLL, 1990b).

Foi com o advento do método de "ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay" que as desvantagens apresentadas pelo "RIA" vieram a ser superadas. Este método é de execução simples e apresenta resultados rápidos e sensíveis. Foi apresentado, por uma primeira vez, por SAUNDERS & BARTLETT (1977), para a detecção de "SEA". Os autores trabalharam com amostras de leite integral, maionese e cachorro quente e verificaram, neste ensaio, uma sensibilidade de 0,4 a 3,2ng/mL.

O método de "ELISA", de acordo com BERGDOLL (1990b) e NOTERMANS & WERNARS (1991), baseia-se nos mesmos princípios do "RIA", sendo que, neste último, ocorre a substituição do marcador radioativo por uma enzima. Configurativamente, o teste de "ELISA" será competitivo quando o antígeno da amostra teste ("analyte") competir com a IgG (imunoglobulina G) marcada com enzima pela mesma ligação com o anticorpo específico adsorvido a um suporte sólido. A ligação da IgG marcada, decresce proporcionalmente em função da presença da amostra teste. A concentração de antígeno da amostra, neste caso, é inversamente proporcional ao produto formado pela reação enzimática. Já no ensaio não competitivo, comumente designado modelo "sandwich", os anticorpos são adsorvidos em uma fase sólida e incubados com a amostra teste. A quantidade de antígeno adsorvido é medido lançando-se mão de anticorpos ligados à enzima (conjugado). Após adição do substrato (agente cromóforo), em se ocorrendo reação positiva, irá surgir coloração

perceptível também a olho nu. Neste modelo, o antígeno deve dispor de, pelo menos, dois epitopos (sítios de ligação) para o anticorpo. Existe a vantagem de que a cor desenvolvida e a quantidade de enzima é diretamente proporcional à concentração de enterotoxina contida na amostra (SAUNDERS & BARTLETT, 1977; STIFFLER-ROSENBERG & FEY, 1978). As enzimas, por sua vez, compatíveis ao preparo do conjugado são peroxidase, β -amilase e fosfatase, apresentando esta última maiores vantagens em função de menor custo e o não contato com substâncias tóxicas, por ocasião do preparo (STIFFLER-ROSENBERG & FEY, 1978; FREED *et al.*, 1982 e FEY *et al.*, 1984).

A fixação dos anticorpos pode ser feita através de placa de microtítulo que é capaz de receber várias amostras. Existe a necessidade de se anexar um leitor de placas (modelo comercial "NT-ELISA, Dr. S. Notermans, Bilthoven, The Netherlands"). Uma outra alternativa relaciona-se com o suporte de bolas de poliestireno, que permite a análise de um volume maior da amostra, conforme as marcas comerciais "TECRA kit" (Biocenterprises Pty. Ltd. Roseville, New South Wales, Australia) e "SET-EIA kit" (Labor Dr. Bomeli AG, Stationstrasse 12, CH-3097 Liebefeld, Bern, Switzerland), cujas leituras podem ser efetuadas em qualquer colorímetro.

A utilização de anticorpos de captura monovalente conferiu ao método de placa "ELISA, RIDASCREEN" (R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany) uma série de vantagens que já vêm, prontamente, sendo aproveitadas com vistas à detecção mais refinada de enterotoxinas estafilocócicas, destacando-se, entre estas, seu elevado grau de especificidade (PARK *et al.*, 1994). Já o modelo denominado "FELISA, Fluorogenic enzyme-linked immunosorbent assay", desenvolvido por BHATTI *et al.*, 1994, com vistas à detecção de "SEB", prima pela sensibilidade, alcançando limites de detecção de 0,1fg/mL para toxina purificada e de, pelo menos, 10pg/g para alimento contaminado. A "Avidina-Biotina ELISA", proposta por HAHN *et al.* (1986), e avaliada por ADESIYUN *et al.* (1992), representa, também, ensaio comercialmente disponível.

Conforme demonstrado por NOTERMANS *et al.* (1978); KUO & SILVERMAN (1980), KAUFFMAN (1980), BERDAL *et al.* (1981), FREED *et al.* (1982), NOTERMANS *et al.* (1983), FEY *et al.* (1984), PARSONNET *et al.* (1985), BAUTISTA *et al.* (1988), EWALD (1988), WINDEMANN *et al.* (1989), VALLE *et al.* (1990), GOYACHE *et al.* (1992), MATHIEU *et al.* (1992), NANU & NARAYAN (1992), PARK *et al.* (1992), PARK *et al.* (1993), BENNETT & McCLURE (1994), diversos trabalhos têm abordado o desenvolvimento, otimização e aplicação do método de "ELISA", que atingiram em média níveis de detecção situados na faixa de 0,1-0,5ng de "SE"/g de alimento.

WIENEKE & GILBERT (1987), BANKES & ROSE (1989), MATHIEU *et al.* (1992) e ADESIYUN *et al.* (1992) reportaram que tanto o teste de "RPLA", como o método de "ELISA", apresentam vantagens comuns quanto a prontidão de resultados (1 a 2 dias),

simplicidade de execução e sensibilidade até o limiar de 0,1-2,0ng/g de enterotoxina. O teste de "RPLA" apresenta contudo maior simplicidade de execução, requer menos equipamentos, mas é menos sensível (0,25ng/mL) em comparação com o teste de "ELISA" (0,1ng/mL). O custo de ambos, para cada ensaio, situa-se na faixa de R\$10,12 (\$US 10).

3 - MATERIAL

3.1 - Linhagens teste

Foram utilizadas 14 linhagens teste de estafilococos coagulase negativos e pauciprodutores de enterotoxina de A a E, com capacidade de síntese variando de 1,4 a 16,8ng/mL para uma ou até três enterotoxinas, segundo a Universidade de Extremadura, Cáceres, Espanha (VALLE *et al*, 1990), de onde procederam. Estas linhagens, coletadas a partir de sítios anatômicos de cabras saudáveis, foram obtidas por intermédio de Dr. Merlin S. Bergdoll¹, e se mostravam assim distribuídas: *S.caprae* (2 amostras), *S.chromogenes* (1 amostra), *S.cohnii* (1 amostra), *S.epidermidis* (1 amostra), *S.haemolyticus* (2 amostras), *S.hylcus* (1 amostra), *S.lentus* (1 amostra), *S.sciuri* (1 amostra), *S.warneri* (2 amostras) e *S.xylosus* (2 amostras).

A **Tabela 3**, p. 42, relaciona as linhagens teste em conformidade com o tipo e quantidade de enterotoxina e a **Tabela 4**, p. 43, as dispõe alfabeticamente por espécie e tipos de enterotoxina produzida, segundo VALLE *et al* (1990).

3.2 - Trezentos gramas aproximadamente de queijo "tipo Minas", semi-curado, suspeito de causar intoxicação alimentar humana

¹ Merlin S. Bergdoll, Food Research Institut, University of Wisconsin, Madison
1925 Willow Drive, Madison, Wisconsin, 53706 Fax: 608 281 1411

Tabela 3 -Quantidades, tipos de enterotoxinas e linhagens teste usadas na pesquisa¹

<i>Staphylococcus</i>	Referência	Enterotoxina	
		Tipo	Quantidade (ng/ml)
<i>epidermidis</i>	10	A	4,0
<i>cohnii</i>	366	A	2,2
<i>warneri</i>	14	B	3,6
<i>haemolyticus</i>	214	B	2,5
<i>warneri</i>	224	B	7,6
<i>cohnii</i>	366	B	8,6
<i>haemolyticus</i>	107	C	3,9
<i>chromogens</i>	146	C	+
<i>cohnii</i>	366	C	5,1
<i>haemolyticus</i>	214	C	5,1
<i>hyicus</i>	129	C	+
<i>xylosus</i>	141	C	5,5
<i>xylosus</i>	335	C	9,1
<i>caprae</i>	163	D	9,3
<i>caprae</i>	339	D	1,4
<i>haemolyticus</i>	107	E	16,8
<i>caprae</i>	163	E	+
<i>lentus</i>	44	E	5,1
<i>xylosus</i>	335	E	4,6
<i>scluri</i>	308	E	3,8

¹De acordo com VALLE *et al* (1990)

+: presente (não quantificada)

Tabela 4 - Linhagens teste e tipo de enterotoxinas usadas na pesquisa¹

<i>Staphylococcus</i>	Referência	Tipos de toxina
<i>caprae</i>	163	D, E
<i>caprae</i>	339	D
<i>chromogenes</i>	146	C,
<i>cohnii</i>	366	A, B, C,
<i>epidermidis</i>	10	A,
<i>haemolyticus</i>	107	C,E
<i>haemolyticus</i>	214	B,C
<i>hyicus</i>	129	C,
<i>lentus</i>	44	E
<i>sciuri</i>	308	E
<i>xylosus</i>	141	C
<i>xylosus</i>	335	C,E
<i>warneri</i>	14	B
<i>warneri</i>	224	B

¹De acordo com VALLE *et al* (1990)

3.3 - Equipamentos, meios de cultivo laboratorial e reagentes

Ágar azul de O-toluidina-DNA, segundo ABNT, MB-3464, 1991. Anexo 1, p. 108;

Ágar "BP", ágar Baird-Parker, Biobrás, Bioquímica do Brasil, Belo Horizonte, MG;

"BHI" - "Brain heart infusion", infuso de cérebro e coração, Biobrás, Bioquímica do Brasil, Belo Horizonte, MG;

"BHI"-2x - "Brain heart infusion", infuso de cérebro e coração em concentração dupla, Biobrás, Bioquímica do Brasil, Belo Horizonte, MG;

"BHI"-2x-0,5 - "Brain heart infusion", infuso de cérebro e coração em concentração dupla, Biobrás, Bioquímica do Brasil, Belo Horizonte, MG, acrescido de 0,5% de "YE", "Yeast extract", extrato de levedura, Oxoid Ltd. Hampshire, United Kingdom;

Ágar P, segundo KLOOS *et al* (1974). Anexo 2, p. 109;

"PCA" - "Plate count agar", ágar padrão para contagem, Difco Laboratories, Detroit, Michigan;

Agitador com temperatura controlada, "Queue Orbital Shaker";

APT, água peptonada tamponada, Biobrás, Bioquímica do Brasil, Belo Horizonte, MG;

Centrífuga refrigerada, marca Beckman, modelo J2HS;

Coluna cromatográfica, "Sephacrose-6B", Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden ;

"ELISA-RIDASCREEN", R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany;

"ELISA, SET-EIA", The Bomelli ball kit - Dr. Bomelli AG, Stationstrasse 12, CH-3097 Liebfeld, Bern Switzerland;

Enterotoxina padrão, "Crude enterotoxin", Toxin Technology, INC., Florida, Miami, USA;

Espectrofotômetro Ustraspec III, Pharmacia, Uppsala, Sweden;

IgG normal e purificada de coelho, produzida pelo Serviço de Pesquisa, DCPD, FUNED²;

"Nz4" - "Nz Amine A", extrato pancreático de caseína digerida, Sheffield Products, Norwich, NY, USA, a 4% acrescido de 1% de "YE" - "Yeast extract", extrato de levedura, Oxoid Ltd. Hampshire, United Kingdom, 0,001% de L-arginina, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA, e 0,1% de KH₂HPO₄, Merck;

"Nz6" - "Nz Amine A", extrato pancreático de caseína digerida, Sheffield Products, Norwich, NY, USA, a 6% acrescido de 1% de "YE" - "Yeast extract", extrato de levedura, Oxoid Ltd. Hampshire, United Kingdom;

"ImunoSCAN Staph Latex Test", Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, USA;

Membrana de diálise, "Spectra/Por membrane dialysis tubing, 6000-8000, 100mm flat width", Los Angeles, California, USA;

Placas de microtitulo, "Cooke Microtiter U or V", Corning, Los Angeles, California, USA";

"PEG"15-20000, polietileno glicol, PM15-20000, Sigma Chemical Co. St. Louis, USA;

Sacos de celulose, "Union Carbide Corp., 3,5cm flat width", Chicago, IL, USA;

"RPLA" ou "SET-RPLA, TD-900", manufaturado por Denka Seiken Co. Ltd., Japan, comercializado por Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England" e adquirido, no Brasil, junto a Valée Diagnóstica, São Paulo;

"TYE" - "Tryptone", triptona, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA, a 3% acrescida de 1% de "YE" - "Yeast extract", extrato de levedura, Oxoid Ltd. Hampshire, United Kingdom;

3.4 - Outros equipamentos, meios de cultivo laboratorial e reagentes de uso geral em laboratório

² Laboratório de Pesquisa, DCPD, FUNED
Caixa Postal 26 30161-970 Belo Horizonte MG Fone: (031) 371 20 77 Fax: (031) 332 25 34

4 - MÉTODOS

4.1 - Métodos para avaliação das linhagens teste

4.1.1 - Estudo taxonômico das linhagens teste

Tentou-se a classificação adansoniana das linhagens teste utilizando-se o programa "*Sistema de Matrizes de Similaridade*", da base de dados da Fundação Tropical de Pesquisas "André Tosello", Campinas, SP, readaptado por Luiz Roberto Martin³, a partir do programa original da "*National Collection of Yeast Cultures*", cujo mecanismo de manuseio pode ser consultado com detalhamentos em LAPAGE *et al* (1973) e GALLO (1990) *apud* CARVALHO (1994).

Tomaram-se como base para elaboração de matrizes publicações descritivas de espécies estafilocócicas elaboradas por KLOOS & SCHLEIFER (1975ab); SCHLEIFER & KLOOS (1975); HÁJEK (1976); KILPPER-BÄLZ & SCHLEIFER (1981); SCHLEIFER *et al* (1982); SCHLEIFER & FISHER (1982); KLOOS *et al* (1976); SCHLEIFER *et al* (1983); KLOOS & SCHLEIFER (1983); DEVRIESE *et al* (1983); SCHLEIFER *et al* (1984); de la FUENTE *et al* (1985); DEVRIESE *et al* (1978); HÁJEK *et al* (1986); FRENEY *et al* (1988); VARALDO *et al* (1988); IGIMI *et al* (1989); BANNERMAN & KLOOS (1990); IGIMI *et al* (1990); KLOOS & WOLFSHOHL (1991); *Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci* (1965) e *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9ª edição (HOLT, 1994). Os critérios fenéticos, uma vez correlacionados para as matrizes, foram aplicados às linhagens teste usadas na pesquisa, de acordo com procedimentos estabelecidos por KLOSS *et al* (1974), Mac FADDIN (1980) e VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992), conforme sumarizado na **Figura 1**, p. 47, e de acordo com o abaixo descrito:

I - Ensaios morfo-tintoriais: aparência de bordas e superfície e pigmentação de colônias em ágar P; arranjo celular; coloração de Gram; crescimento em ágar "BP".

³ Luís Roberto Martin, Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP
Caixa Postal 6121 12083-970 Campinas SP Fone: (019) 239 78 90

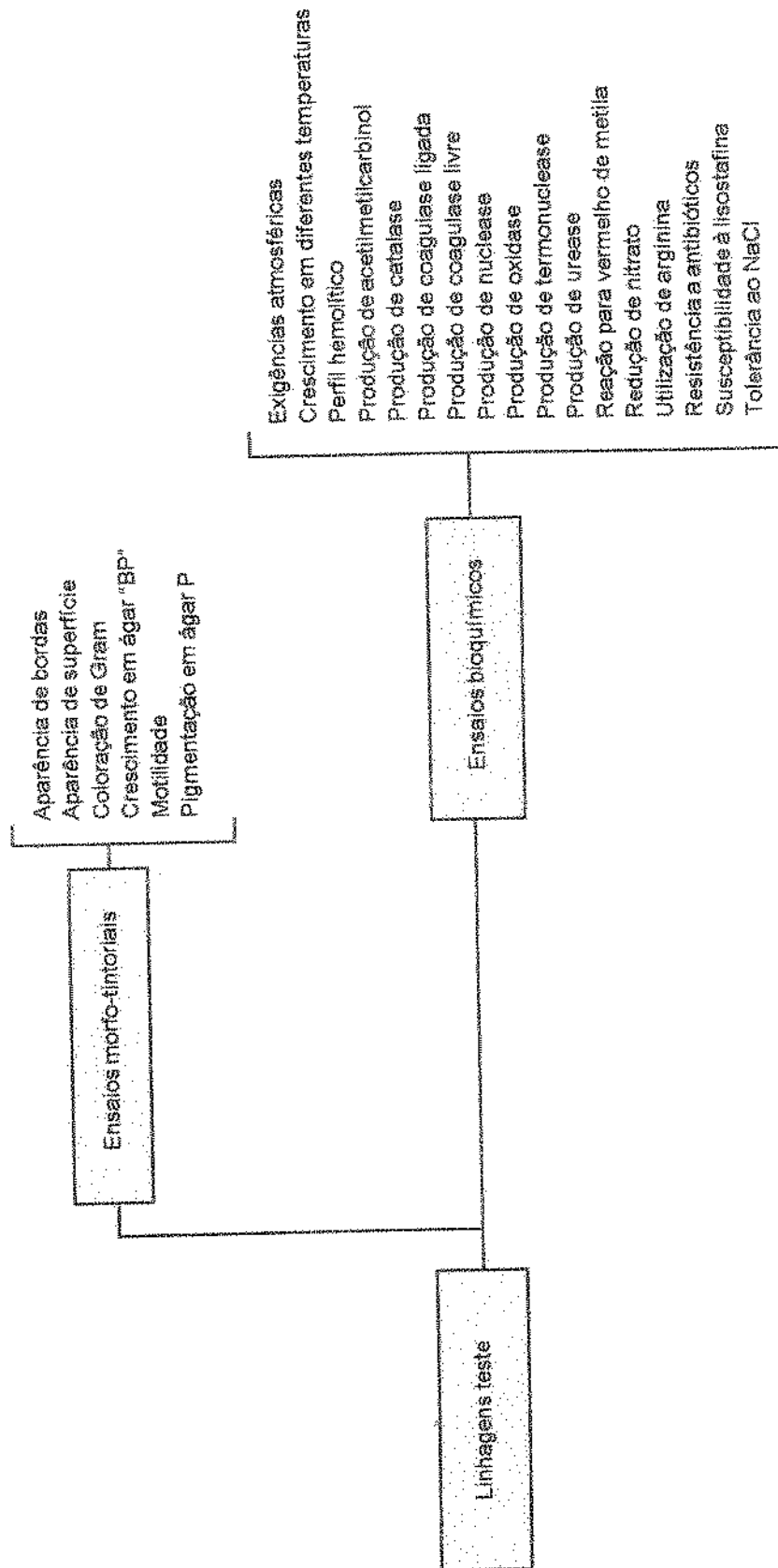


Figura 1 - Estudo taxonômico das linhagens teste usadas na pesquisa

// - Ensaios bioquímicos: crescimento em diferentes condições de tempo e temperatura; exigências atmosféricas em meio fluido de tioglicolato; produção de acetil metil carbinol, catalase, coagulase livre, coagulase ligada, nuclease, fermonuclease, oxidase e urease; reação para vermelho de metila; redução de nitrato; utilização aeróbica dos monossacarídeos L(+)-arabinose, B-D(-)-frutose, L(-)-fucose, D(+)-galactose, D(+)-glicose, D(+)-manose, D(-)-ribose, salicina e D(+)-xilose; utilização aeróbica dos dissacarídeos e dos açúcares alcoólicos lactose, maltose, D(-)-manitol, rafinose, sacarose, D(+)-trealose, D(+)-turanose, rafinose e xilitol; utilização anaeróbica de D(+)-glicose e D(+)-manitol; utilização de arginina; perfil hemolítico em ágar sangue humano, ovino e bovino; perfil oxidativo e fermentativo; tolerância ao NaCl a 10, 15, 18 e 20%; resistência aos antibióticos oxacilina (8µg/mL) e novobiocina (1,6µg/mL) e susceptibilidade à lisostafina (25µg/mL).

4.1.2 - Produção de enterotoxinas pelas linhagens teste, em meios de cultivo laboratorial (Figura 2)

4.1.2.1 - Método da "membrana sobre ágar"

Após obtenção de culturas jovens das linhagens teste por incubação em caldo "BHI", durante 24 horas a 37°C, placas de "membrana sobre ágar", preparadas com 25mL de "BHI"-2x recobertas com disco de membrana de diálise, foram inoculadas com 0,5mL de inóculo e incubadas a 37°C, por 24 horas. As culturas assim obtidas, foram lavadas com 2,5mL de Na₂HPO₄ 0,01 M, em três etapas, usando-se 1mL, 1mL e 0,5mL deste tampão. O líquido de lavagem foi centrifugado sob refrigeração a 7400g, durante 20min., e o sobrenadante utilizado para averiguação de produção de enterotoxina de acordo com HALLANDER (1965), CASMAN *et al* (1969) e JARVIS & LAWRENCE (1970). Comparativamente, obedecendo a este delineamento, outras formulações de meios sólidos, contendo 1,5% de ágar-ágar, foram testadas além do meio "BHI"-2x:

/- "BHI"-2x-0.5;

II - "TYE";

III - "Nz6";

IV - "Nz4".

4.1.2.2 - Método do "saco de diálise"

Foram adicionados 50mL de caldo "BHI"-2x dentro de sacos de celulose de 47cm, que, após fechamento das duas pontas, foram dispostos em frascos de "Erlenmayer" de 250mL. Uma vez esterilizados, adicionaram-se 20mL de Na_2HPO_4 0,1M estéril e, em seguida, 1mL do inóculo bacteriano preparado conforme descrito em 4.1.2.1. Os frascos foram mantidos em agitador, a 180rpm, a 37°C, durante 24 horas. Das culturas centrifugadas, tomou-se o fluido sobrenadante para pesquisa de enterotoxinas de acordo com DONNELLY *et al* (1968). Comparativamente, outras formulações de meios líquidos foram testadas para a produção de enterotoxinas, conforme anteriormente descrito em 4.1.2.1. Com intuito de se reduzir o grau de diluição da enterotoxina presente, 10mL de tampão fosfato foram também utilizados em experimento paralelo. Prevendo-se, ainda, a possibilidade de ausência de produção de enterotoxina nos fluidos sobrenadantes das amostras aplicou-se para estas o procedimento de concentração de fluidos com "PEG" 15-20000, utilizando-se para tal agitação dos frascos de "Erlenmeyer", em agitador a 200rpm e se trabalhando somente com dois meios de cultivo laboratorial que foram selecionados em função do melhor desempenho apresentado anteriormente.

4.1.3 - Detecção e quantificação de enterotoxinas produzidas pelas linhagens teste, em meios de cultivo laboratorial (Figura 2)

4.1.3.1 - Método da sensibilidade ótima em placa ("OSP")

Para a confirmação de que as linhagens teste eram efetivamente pauciprodutoras de "SE", utilizou-se o método "OSP". Neste teste, de acordo com ROBBINS *et al* (1974), 3 mL de ágar Noble fundido foi adicionado a placas de Petri de 50mm de diâmetro; uma vez solidificado, o ágar foi perfurado, de forma a constituir sete orifícios, seguindo molde próprio; a antitoxina específica (4µg/mL) foi colocada no orifício central, a toxina padrão (2µg/mL) foi disposta nos dois orifícios menores e a amostra teste nos quatro orifícios mais externos. As placas foram incubadas a 37°C, por 24h, em câmara úmida. Reações positivas foram determinadas pela formação de linhas de precipitina formadas entre as amostras a testar com a toxina e antitoxina padrão. Fluidos sobrenadantes concentrados foram também testados por este método.

4.1.3.2 - Método de aglutinação passiva reversa em látex ("RPLA" ou "SET-RPLA")

Os procedimentos deste ensaio foram realizados, em triplicata, de acordo com IGARASHI *et al* (1986), fazendo-se uso, para confirmação da presença de enterotoxina, de fluidos sobrenadantes de culturas anteriormente obtidos. Neste procedimento, 25µL da amostra a se pesquisar foram aplicadas nos orifícios da placa de microtítulo e, em seguida, adicionaram-se outros 25µL de partículas de látex sensibilizadas com antitoxina específica. A placa de microtítulo, uma vez inoculada, foi mantida por até 24 horas à temperatura ambiente, sem agitação. A leitura foi procedida contra luz incidente, em contador de colônias.

Seguindo orientação de PARK & SZABO (1986), não se utilizaram, neste experimento, as quatro primeiras filas, as mais externas da placa de microtítulo. Adotou-se sempre a inoculação paralela de látex controle, para cada orifício inoculado com o fluido teste; somente aquelas amostras que se mostraram positivas, foram então, em uma segunda etapa, submetidas a diluições em tampão fosfato salina e retestadas até aparecimento final de resultado negativo, de forma a se estimar a quantidade de "SE" foi produzida. Amostras que, porventura, se mostrassem negativas à produção de "SE", tiveram seus fluidos sobrenadantes de cultura tratados com "PEG"15-20000, e, em seguida, foram igualmente testadas por "SET-RPLA".

Buscando maior acuidade de resultados, procurou-se estabelecer a

sensibilidade e especificidade do método. Enterotoxinas padrão dos tipos A, B, C e D, de concentração conhecida foram convenientemente diluídas em tampão fosfato salina, de forma a se alcançar a última leitura positiva e imediatamente após a primeira leitura negativa na placa de microtítulo; cada enterotoxina, por sua vez, foi avaliada contra látex sensibilizado com anti"SEA", anti"SEB", anti"SEC" e anti"SED", para avaliação da presença ou não de reações cruzadas.

Para a prevenção ou eliminação de reações inespecíficas, adotaram-se os seguintes procedimentos para o fluido sobrenadante das linhagens teste:

I - tratamento com soro normal: em tubo "Eppendorf" contendo 500 μ L de fluido sobrenadante das linhagens teste foram isoladamente adicionados 2,5% (v/v), de soro normal de cavalo, carneiro, coelho e novilho, de acordo com PARK *et al* (1993);

II - tratamento térmico: tubo "Eppendorf" contendo 500 μ L de fluido sobrenadante das linhagens teste foi aquecido, em banho-maria, a 70°C, durante 3min, de acordo com PARK *et al* (1993);

III - tratamento com IgG normal de coelho, purificada de acordo com EY *et al* (1978): em tubo "Eppendorf" contendo 500 μ L de fluido sobrenadante das linhagens teste foi adicionado 5% (v/v) de solução de IgG em concentração igual a 0,74 μ g/mL.

Uma vez definido, entre os métodos acima descritos, o melhor tratamento, testou-se este, em triplicata, com fluidos sobrenadantes (obtidos conforme descrito em 4.1.2.1) de *S.aureus* FRI-184 (não produtor de "SE") e *S.aureus* FRI-S6 (produtor de "SEA" e "SEB", esta última, em quantidades diminutas). Este teste controle objetivou assegurar a ausência de indução de resultados falso-positivos e se buscou confirmar, por outro lado, a não interferência em resultados oriundos das linhagens teste, pauciprodutoras de "SE".

4.1.4 - Comportamento e produção de enterotoxinas pelas linhagens teste usando alimentos

4.1.4.1 - Inoculação experimental das linhagens teste, em alimentos

Quatorze unidades de leite integral tipo "longa vida" (500mL) e 14 unidades de presunto cozido (500g) fatiado em condições assépticas foram, de forma individualizada e em duplicata, experimentalmente inoculados com as 14 linhagens teste. A densidade populacional foi estabelecida a partir de leitura de absorvância a 550nm e contagem de células a partir de diluições seriadas, em "PCA", de forma a se gerar inóculo inicial (tempo zero) aproximado em 10^4 UFC/mL ou g de alimento.

Almejando oferecer homogeneidade de condições aos microrganismos a se estudar, os alimentos a serem inoculados apresentaram, ao longo do experimento, a mesma procedência comercial. Antes de se executar a inoculação das linhagens teste, estes substratos foram submetidos a análise microbiológica de acordo com as exigências legais (Portaria nº 01, SNVS/MS, de 28 de janeiro de 1987) e seguindo metodologia preconizada por VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992).

4.1.4.2 - Contagem das linhagens teste inoculadas em alimentos, após 24 e 48h de incubação

No período de 24 e 48h, ambos substratos, leite integral tipo "longa vida" e presunto cozido, foram analisados quanto à contagem de células viáveis das linhagens teste inoculadas. Para a quantificação, utilizou-se ágar "BP" incubado a 37°C até 72h, semeando por espalhamento 0,1mL das diluições seriadas preparadas a partir da homogeneização de 25mL de leite e 25g de presunto em APT, de acordo com VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992).

4.1.4.3 - Detecção de enterotoxinas produzidas pelas linhagens teste em alimentos

Para detecção de enterotoxinas nas amostras de alimentos foi utilizado o teste de "ELISA, SET-EIA". Para este ensaio foram empregados 20mL do leite e 20mL de extrato de presunto obtido a partir de prévia homogeneização de 125g da amostra em 150mL de tampão salina-fosfato centrifugadas a 7400g, durante 20min. As alíquotas foram tomadas após incubação de 24 e 48h e a verificação da presença de enterotoxina, utilizando bolas de poliestireno sensibilizadas com antitoxinas específicas, seguiu idêntico procedimento reportado através do "kit de "ELISA, SET-EIA", conforme preconizado por FEY & PFISTER (1983). Para os extratos de presunto efetuou-se também pesquisa de "SE" pelo método de "RPLA" descrito em 4.1.3.2, conforme procedimentos para fluidos sobrenadantes das linhagens teste.

Foi utilizada a estratégia de concentração de leite integral tipo "longa vida" e presunto cozido que, após queima a cobre, foram submetidos a cromatografia de afinidade em coluna de "Sephrose-6B", de acordo com DICKIE & AKHTAR (1989), para aqueles substratos que, porventura, viessem a demonstrar ausência ou baixa produção de "SE", depois de produção confirmada em meios de cultivo laboratorial. Os extratos concentrados assim obtidos foram então reanalisados por "RPLA". Esta metodologia foi previamente validada através de ensaio piloto que se valeu de duas amostras de mesmo queijo, sabidamente não enterotoxigênicas as quais, foram experimentalmente inoculadas com 10ng e 1ng de "SEA" padrão.

A **Figura 2**, p. 54, apresenta o fluxograma adotado para produção e detecção de enterotoxinas pelas linhagens teste usadas na pesquisa, em condições de cultivo laboratorial e usando alimentos.

4.2 - Métodos para avaliação do surto de intoxicação alimentar humana

4.2.1 - Contagem de estafilococos no queijo suspeito

Para o isolamento e contagem de estafilococos, utilizou-se ágar "BP" incubado a 37°C durante 48h, semeado por espalhamento com 0,1mL das diluições seriadas preparados a partir da homogeneização de 25mL do queijo em APT, de acordo com VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992).

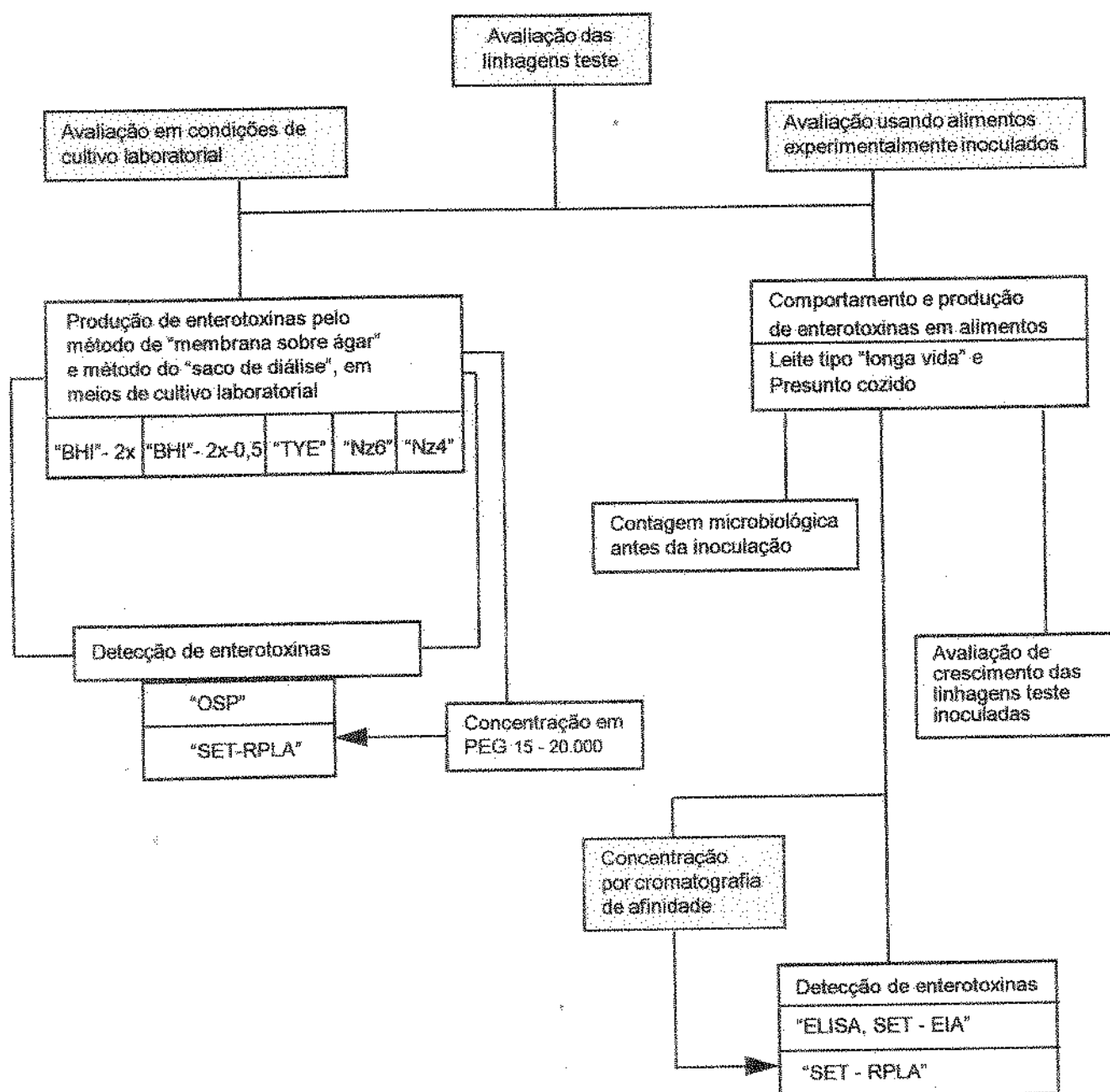


Figura 2 - Procedimentos analíticos para produção e detecção de enterotoxina pelas linhagens teste usadas na pesquisa

4.2.2 - Estudo taxonômico da linhagem isolada a partir do queijo suspeito

Uma vez isolada, efetuou-se o estudo taxonômico da linhagem envolvida no surto, seguindo delineamento analítico proposto em 4.1.1.

4.2.3 - Produção e detecção de enterotoxina pela linhagem isolada do queijo suspeito, em meios de cultivo laboratorial (Figura 3)

A verificação da capacidade enterotoxigênica da linhagem envolvida, em condições de cultivo laboratorial, seguiu delineamento analítico proposto em 4.1.2 onde se buscou verificar a produção de enterotoxinas A, B, C, e D. Com o objetivo especial de se esclarecer o tipo de enterotoxina realmente era produzida foi acrescida à metodologia o emprego de "ELISA", "SET-EIA", "RPLA" e "ELISA-RIDASCREEN", esta última elaborada com anticorpos monoclonais e executada de acordo com PARK *et al* (1994), seguindo idêntico procedimento reportado através de "kit" próprio. Para tal, uma vez definida qual enterotoxina era produzida, os fluidos sobrenadantes de cultura procedente de meios de cultivo laboratorial foram selecionados por melhor desempenho e adequacidade e juntados sob forma de "pool", para análise. Testou-se então este, na forma neutralizada e não neutralizada com anti"SE" específica. Paralelamente, usou-se como controle de eficácia deste instrumento alternativo de análise, a neutralização com respectiva antitoxina para se descartar possível resposta cruzada para outras, fluido sobrenadante de culturas de *S.aureus*, linhagem controle exclusiva produtora da enterotoxina constatada, fluido este, preparado nas mesmas condições do fluido teste.

4.2.4 - Pesquisa direta de enterotoxina pré-formada no queijo suspeito (Figura 3)

O procedimento para a pesquisa de enterotoxina pré-formada no queijo suspeito realizou-se de acordo com o reportado no item 4.1.4. Objetivou-se,

nesta etapa, também, a elucidação do tipo de enterotoxina pré-elaborada realmente portava o queijo suspeito. Assim, uma vez definida qual enterotoxina era produzida, de forma similar ao relatado em 4.2.3, implementou-se a metodologia com os ensaios de "ELISA, SET-EIA", "RPLA" e "ELISA-RIDASCREEN" para os quais, desta feita, extrato concentrado do queijo suspeito, pela técnica de cromatografia de afinidade, reportada em 4.1.4.3, foi estudado na forma neutralizada e não neutralizada com a anti"SE" específica, usando-se como controle fluido sobrenadante de *S.aureus*, linhagem produtora exclusiva da enterotoxina constatada, conforme descrito em 4.1.2.

4.2.5 - Comportamento e produção de enterotoxina, em alimentos experimentalmente inoculados com a linhagem isolada do queijo suspeito

Para estudo do comportamento e produção de enterotoxina em alimentos, utilizou-se de leite integral tipo "longa vida" e presunto cozido que foram experimentalmente inoculados com a linhagem envolvida no surto, conforme descrito em 4.1.4.2., para as linhagens teste usadas na pesquisa.

A metodologia analítica acima descrita, voltada para a elucidação do surto encontra-se resumida no fluxograma contido na **Figura 3**, p. 57.

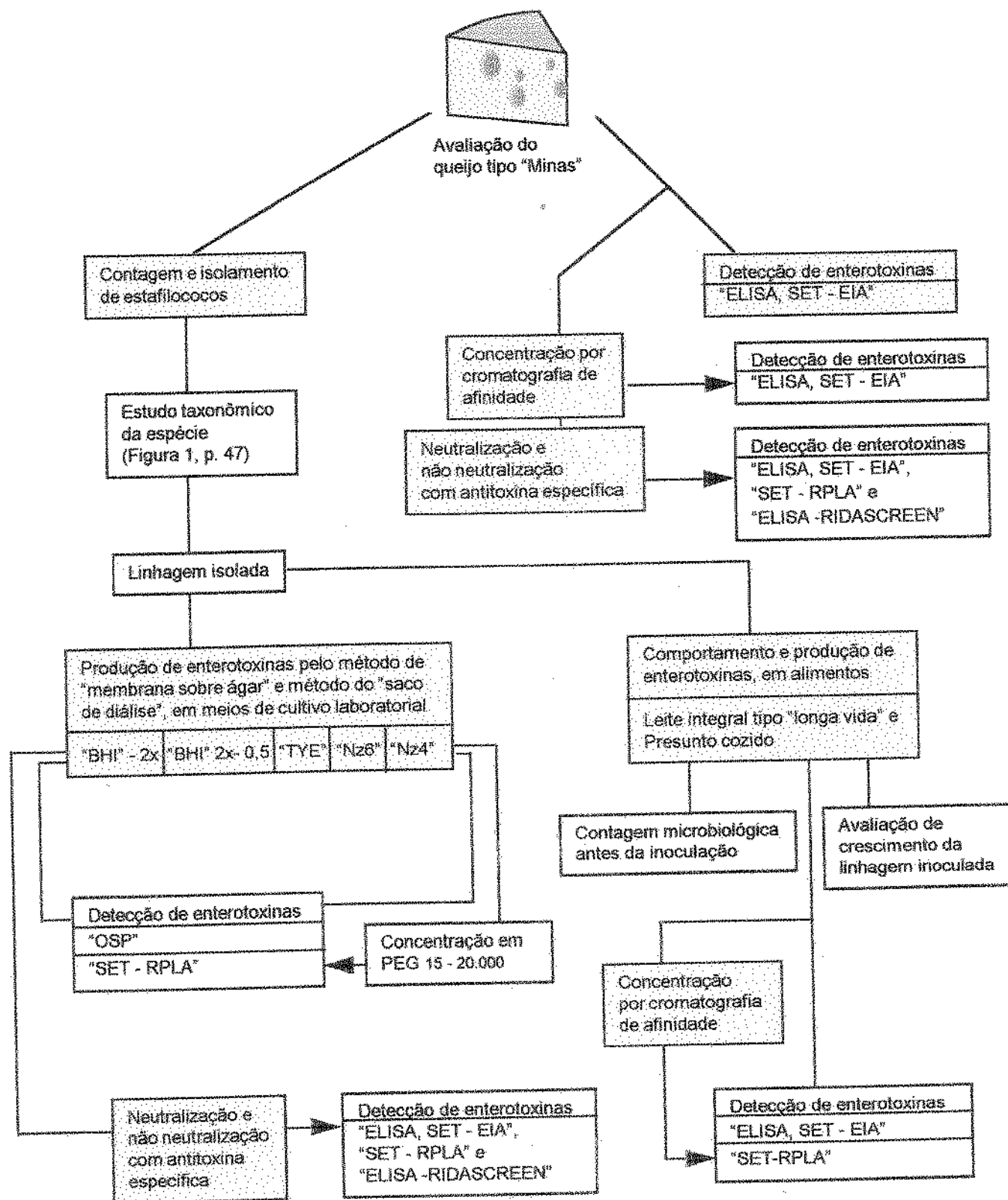


Figura 3 - Procedimentos analíticos para elucidação do surto de intoxicação alimentar humana

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Do estudo taxonômico das linhagens teste e da linhagem envolvida no surto

Os resultados contidos nas **Tabelas 5 a 16**, p. 59 a 70, mostram os caracteres fenéticos obtidos a partir de testes laboratoriais conduzidos com vistas a análise adansoniana das linhagens teste e linhagem envolvida no surto.

Segundo GALLO (1990) *apud* CARVALHO (1994), a taxonomia adansoniana, também denominada taxonomia numérica, prima-se por permitir o ajuntamento de unidades taxonômicas com auxílio de programas computadorizados baseando-se em similaridades e diferenças existentes entre um grupo de microrganismos. Os resultados apresentam grau de confiabilidade crescente quanto mais se aproximam do valor 1,0, sendo tal índice mais facilmente alcançado a partir de matriz que se utiliza de 60 a 70 caracteres, onde cada um destes pressupõe mesma importância e peso, na classificação.

Nesta pesquisa, as linhagens teste e a linhagem envolvida no surto foram estudadas à luz de cerca de 50 caracteres mas, somente 23, por serem comuns, mostraram-se plenamente utilizáveis à confecção da matriz. Esta situação inviabilizou conseqüentemente, por insuficiência dos caracteres necessários, a reclassificação das linhagens teste. Entre estas, exceção foi feita, com exclusividade a *S. haemolyticus*, ref. 107, que apresentou valor de similaridade igual a 0,96 e a linhagem envolvida no surto, estirpe coagulase positiva, que atingiu valor de similaridade igual a 0,99 e pôde ser classificada como *S. aureus* sub-espécie *aureus*. Esta última, em função de proceder de análise conduzida na Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, passou então a ser designada como *S. aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED".

Para além da taxonomia adansoniana, buscando maior entendimento dos dados obtidos, através de análise mais pormenorizada, a visualização de alguns caracteres pertinentes a cada espécie, de acordo com os dados apresentados, tornam-se claramente perceptíveis certas discrepâncias, no que tange à esperada parença entre mesmas espécies. Assim é que *S. lentus*, ref. 44, que deveria apresentar, conforme o próprio nome indica, crescimento lento, desenvolveu-se em 24h, em ágar P (**Tabela 9**, p. 63); *S. hyicus* e *S. lentus*, ref. 129 e 44, utilizaram

Tabela 5 - Características morfológicas das linhagens teste usadas na pesquisa, em ágar P

Staphylococcus/ Ref.	Superfície da colônia			Bordas		Arranjo das células			
	plana	meio convexa	convexa	inteiras	grenadas	cachos	tétrades	pares	isoladas
<i>aureus</i> "FUNED"	+			+		-	-	++	+++
<i>caprae</i> 163			+	+		+	-	+	++
<i>caprae</i> 339			+	+		-	+	+++	++
<i>chromogenes</i> 146			+		+	++	+	+	+++
<i>cohnii</i> 366	+			+		-	-	+	+++
<i>epidermidis</i> 10			+	+		+	+	+++	++
<i>haemolyticus</i> 107	+			+		-	++	+++	+
<i>haemolyticus</i> 214			+	+		+	+	++	+++
<i>hyicus</i> 129		+		+		-	+	++	+++
<i>lentus</i> 44	+			+		-	+	++	++
<i>sciuri</i> 308		+		+		-	+	++	+++
<i>warneri</i> 14			+	+		++	-	+	+
<i>warneri</i> 224		+			+	+++	-	+	+
<i>xylosus</i> 141			+	+		-	+	++	+++
<i>xylosus</i> 335		+		+		++	+	+	+

Ágar P, segundo KLOOS et al (1974)

Todas linhagens teste apresentaram-se sob a forma de cocos Gram positivos

Ref.: Referência

+: positivo

-: negativo

++: predomínio de até 30%

+++ : predomínio de mais de 50%

Tabela 6 - Características de crescimento das linhagens teste usadas na pesquisa, em meios específicos

<i>Staphylococcus</i>	Ref.	Características pesquisadas			
		Lectinase*	Redução de telúrio*	Pigmento**	Motilidade***
<i>aureus</i>	"FUNED"	-	+	laranja (+)	-
<i>caprae</i>	163	-	+	creme (+)	-
<i>caprae</i>	339	-	+	branco (-)	-
<i>chromogenes</i>	146	-	+	creme (+)	-
<i>cohnii</i>	366	-	+	branco (-)	-
<i>epidermidis</i>	10	-	+	branco (-)	-
<i>haemolyticus</i>	107	-	+	amarelo (+)	-
<i>haemolyticus</i>	214	-	+	branco (-)	-
<i>hyicus</i>	129	-	+	branco (-)	-
<i>lentus</i>	44	-	+	branco (-)	-
<i>scluri</i>	308	-	+	branco (-)	-
<i>warneri</i>	14	-	+	creme (+)	-
<i>warneri</i>	224	-	+	creme (+)	-
<i>xylosus</i>	141	-	+	creme (+)	-
<i>xylosus</i>	335	-	+	branco (-)	-

Ref.: referência

* Provas realizadas em ágar "BP" (ágar Baird Parker)

** Prova realizada em ágar P, segundo KLOOS *et al* (1974)

*** Prova realizada em ágar motilidade, segundo Mac FADDIN (1980)

(+): positivo

(-): negativo

Tabela 7 - Exigências atmosféricas para desenvolvimento e metabolismo das linhagens teste usadas na pesquisa

<i>Staphylococcus</i>	Referência	Crescimento em meio fluido de tioglicolato de sódio a 37°C*		Metabolismo a 37°C**	
		Aeróbio	Anaeróbio	Oxidativo	Fermentativo
<i>aureus</i>	"FUNED"	+	+	++	++
<i>caprae</i>	163	+	-	+	+
<i>caprae</i>	339	+	-	+	+
<i>chromogenes</i>	146	+	-	+	+
<i>cohnii</i>	366	+	+	++	++
<i>epidermidis</i>	10	+	-	+	+
<i>haemolyticus</i>	107	+	-	+	+
<i>haemolyticus</i>	214	+	-	+	+
<i>hyicus</i>	129	+	-	+	+
<i>lentus</i>	44	+	-	+	+
<i>scluri</i>	308	+	-	-	+
<i>warneri</i>	14	+	-	+	+
<i>warneri</i>	224	+	-	+	+
<i>xylosus</i>	141	+	-	+	+
<i>xylosus</i>	335	+	-	-	+

* +: positivo; - negativo

**+: amarelo esverdeado; ++: amarelo

Tabela 8 - Tolerância das linhagens teste usadas na pesquisa ao NaCl, em diferentes concentrações

<i>Staphylococcus</i>	Referência	Concentrações de NaCl em ágar P a 37°C/48h			
		10%	15%	18%	20%
<i>aureus</i>	*FUNED*	+	+	+	-
<i>caprae</i>	163	+	+	+	+
<i>caprae</i>	339	+	+	+	+
<i>chromogenes</i>	146	+	+	+	+
<i>cohnii</i>	366	+	+	+	+
<i>epidermidis</i>	10	+	+	+	+
<i>haemolyticus</i>	107	+	+	+	+
<i>haemolyticus</i>	214	+	+	+	+
<i>hyicus</i>	129	+	+	+	+
<i>lentus</i>	44	+	+	+	+
<i>sciuri</i>	308	+	+	-	-
<i>warneri</i>	14	+	+	+	+
<i>warneri</i>	224	+	+	+	+
<i>xylosus</i>	141	+	+	+	+
<i>xylosus</i>	335	+	+	-	-

Ágar P, segundo KLOOS *et al* (1974)

+: positivo

-: negativo

Tabela 9 - Crescimento das linhagens teste usadas na pesquisa, em diferentes condições de tempo e temperatura

<i>Staphylococcus</i>	Referência	Condições de desenvolvimento									
		37°C					45°C		15°C		
		Ágar "BP"			Ágar P		Ágar P		Ágar P		
		24h	48h	72h	24h	48h	24h	48h	48h	72h	
<i>aureus</i>	"FUNED"	+	+	+	+	+	-	+	-	-	
<i>caprae</i>	163	-	-	+	+	+	+	+	-	-	
<i>caprae</i>	339	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
<i>chromogenes</i>	146	-	-	+	+	+	-	-	-	+	
<i>cohnii</i>	366	-	+	+	+	+	-	-	-	-	
<i>epidermidis</i>	10	-	-	+	+	+	-	+	-	-	
<i>haemolyticus</i>	107	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
<i>haemolyticus</i>	214	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
<i>hlycus</i>	129	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
<i>lentus</i>	44	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
<i>scluri</i>	308	-	-	+	-	+	-	-	-	+	
<i>warneri</i>	14	-	-	+	+	+	-	-	-	+	
<i>warneri</i>	224	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
<i>xylosus</i>	141	-	+	+	+	+	-	-	-	+	
<i>xylosus</i>	335	-	+	+	+	+	-	-	+	+	

Ágar P, segundo KLOOS *et al* (1974)

Ágar "BP": ágar Baird-Parker

+: positivo

-: negativo

Tabela 10 - Caracterização bioquímica das linhagens teste usadas na pesquisa

Staphylococcus	Ref.	Características bioquímicas									
		Catalase	Coagulase livre	Coagulase ligada	TNase	DNase	Oxidase	Urease	Redução de nitrato	VM/VP	Utilização de arginina
<i>aureus</i>	"FUNED"	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>caprae</i>	163	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
<i>caprae</i>	339	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>chromogenes</i>	146	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>cohnii</i>	366	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>epidermidis</i>	10	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>haemolyticus</i>	107	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>haemolyticus</i>	214	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>hycus</i>	129	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>lentus</i>	44	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
<i>scluri</i>	308	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>warneri</i>	14	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>warneri</i>	224	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
<i>xylosus</i>	141	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>xylosus</i>	335	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-

Ref. Referência
VM/VP: Reação de Vermelho de Metila/"Voges-Proskauer"

Tabela 11 - Utilização anaeróbia de glicose e manitol pelas linhagens teste usadas na pesquisa

<i>Staphylococcus</i>	Referência	D(+) Glicose	D(+) Manitol
<i>aureus</i>	"FUNED"	+	+
<i>caprae</i>	163	+	+/-
<i>caprae</i>	339	+	+/-
<i>chromogenes</i>	146	+	-
<i>cohnii</i>	366	+	-
<i>epidermidis</i>	10	+	-
<i>haemolyticus</i>	107	+	+/-
<i>haemolyticus</i>	214	+	-
<i>hyicus</i>	129	+	+
<i>lentus</i>	44	+	+
<i>sciuri</i>	308	+	+/-
<i>warneri</i>	14	+	-
<i>warneri</i>	224	+	-
<i>xylosus</i>	141	+	-
<i>xylosus</i>	335	+	+/-

+: completamente ácido
 +/-: ácido/alcalino

Tabela 12 - Utilização aeróbia de monossacarídeos pelas linhagens teste usadas na pesquisa

<i>Staphylococcus</i>	Ref.	D(+) glicose	B-D(-) frutose	D(+) galactose	D(+) manose	D(+) xilose	L(+) arabinose	D(-) ribose	L(-) fucose	salicina
<i>aureus</i>	"FUNED"	+	+	+	+	-/+	-/+	+	-	+
<i>caprae</i>	163	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>caprae</i>	339	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>chromogenes</i>	146	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cohnii</i>	366	+/-	+	+	+	-/+	-	+	-	+
<i>epidermidis</i>	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>haemolyticus</i>	107	+/-	+	+	-/+	-/+	-/+	+	-/+	+
<i>haemolyticus</i>	214	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>hyleus</i>	129	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>lentus</i>	44	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sciuri</i>	308	+/-	+	+	+	+	+	+	-/+	+
<i>warneri</i>	14	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>warneri</i>	224	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>xylosus</i>	141	+/-	+	+	+	+	+	-/+	-	+
<i>xylosus</i>	335	+/-	+	+	+	+	+	+	-	-

Ref.: Referência
+: completamente ácido
+/-: ácido/alcalino
-/+ : alcalino/ácido

Tabela 13 - Utilização aeróbia de di e trissacarídeos e açúcares alcoólicos pelas linhagens teste usadas na pesquisa

<i>Staphylococcus</i>	Ref.	maltose	lactose	sacarose	D(+) trealose	D(+) turanose	rafinose	D-manitol	xilitol
<i>aureus</i>	"FUNED"	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>caprae</i>	163	+	+	+	+	+	+	+/-	-
<i>caprae</i>	339	+	+	+	+	+	+	+/-	-
<i>chromogenes</i>	146	+	+	+	+	+	+	+/-	-
<i>cohnii</i>	366	+	+	+	-	-/+	-	+/-	-
<i>epidermidis</i>	10	+	+	+	+	+	+	+/-	-
<i>haemolyticus</i>	107	+	+	+	+	+	-	+/-	-
<i>haemolyticus</i>	214	+	+	+	+	+	+	+/-	-
<i>hyicus</i>	129	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-
<i>lentus</i>	44	+	+	+	+	+	+	+/-	-
<i>scluri</i>	308	+	+	+	+/-	-/+	-	+/-	-
<i>warneri</i>	14	+	+	+	+	+	+	+/-	-
<i>warneri</i>	224	+	+	+	+	+	+	+/-	-
<i>xylosus</i>	141	+	+	+	+	+	-	+/-	-
<i>xylosus</i>	335	+	+	+	+	+	-	+/-	+/-

Ref.: Referência

+: completamente ácido

+/-: ácido/alcalino

-/+ : alcalino/ácido

Tabela 14 - Perfil hemolítico das linhagens teste usadas na pesquisa

<i>Staphylococcus</i>	Referência	Hemólise em ágar sangue a 37°C/48h		
		Ovino	Humano	Bovino
<i>aureus</i>	"FUNED"	+++	+	+++
<i>caprae</i>	163	-	-	-
<i>caprae</i>	339	-	-	-
<i>chromogenes</i>	146	-	-	-
<i>cohnii</i>	366	-	++	+
<i>epidermidis</i>	10	-	-	-
<i>haemolyticus</i>	107	+++	+++	+++
<i>haemolyticus</i>	214	-	-	-
<i>hyicus</i>	129	-	-	-
<i>lentus</i>	44	-	-	-
<i>scluri</i>	308	-	-	-
<i>warneri</i>	14	-	-	-
<i>warneri</i>	224	-	-	-
<i>xylosus</i>	141	-	-	-
<i>xylosus</i>	335	-	-	-

+; traço
++; moderado
+++; forte

Tabela 15 - Resistência à novobiocina e oxacilina das linhagens teste usadas na pesquisa

<i>Staphylococcus</i>	Referência	Novobiocina (1,6µg/ml)	Oxacilina (8µg/ml)
<i>aureus</i>	"FUNED"	-	+
<i>caprae</i>	163	-	-
<i>caprae</i>	339	-	-
<i>chromogenes</i>	146	-	-
<i>cohnii</i>	366	-	-
<i>epidermidis</i>	10	+	-
<i>haemolyticus</i>	107	-	-
<i>haemolyticus</i>	214	+	-
<i>hyicus</i>	129	-	-
<i>lentus</i>	44	+	-
<i>scluri</i>	308	+	-
<i>warneri</i>	14	-	-
<i>warneri</i>	224	-	-
<i>xylosus</i>	141	+	-
<i>xylosus</i>	335	+	-

+ : resistente

- : sensível

Tabela 16 - Susceptibilidade à lisostafina pelas linhagens teste usadas na pesquisa

Staphylococcus	Referência	Susceptibilidade
		lisostafina (25µg/mL)
<i>aureus</i>	Funed	+
<i>caprae</i>	163	-
<i>caprae</i>	339	+
<i>chromogenes</i>	146	+
<i>cohnii</i>	366	-
<i>epidermidis</i>	10	-
<i>haemolyticus</i>	107	-
<i>haemolyticus</i>	214	-
<i>hyicus</i>	129	-
<i>lentus</i>	44	+
<i>scluri</i>	308	-
<i>warneri</i>	14	-
<i>warneri</i>	224	-
<i>xylosus</i>	141	-
<i>xylosus</i>	335	-

+: sensível

-: resistente

D(+)-manitol (**Tabela 11**, p. 65), em condições de anaerobiose, prova tida como importante na distinção de *S.aureus* das espécies *S.hylcus*, *S.intermedius* e *S.delphini*; *S.xylosus*, ref. 141, não utilizou o açúcar xilitol (**Tabela 13**, p. 67) e *S.haemolyticus*, ref. 214 (**Tabela 14**, p. 68) não se mostrou capaz de lisar hemácias de sangue de carneiro, coelho e também sangue humano.

Pôde-se constatar, contudo, que todos estafilococos analisados, linhagens teste e *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", apresentaram-se como cocos Gram positivos, isolados e agrupados principalmente em pares e tétrades, imóveis, redutores de telurito, não produtores de lecitinase e produtores de catalase e acetil metil carbinol (**Tabelas 5, 6 e 10**, p. 59, 60 e 64). Desenvolveram-se em ágar P adicionado de 15% de NaCl, a 37°C e também em ágar P e ágar "BP", em um período de até 48h, nesta mesma temperatura (**Tabelas 8 e 9**, p. 62 e 63). Todos utilizaram em anaerobiose os açúcares D(+)-glicose e β -D(-)-frutose, D(+)-galactose, maltose, lactose e sacarose, em aerobiose (**Tabelas 11, 12 e 13**, p. 65, 66 e 67), demonstrando sensibilidade à presença de oxacilina, em concentração de 8 μ g/mL (**Tabela 15**, p. 69).

Em oposição a *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", nenhuma das linhagens teste produziram coagulase livre e ligada e igualmente não apresentaram produção de TNase (**Tabela 10**, p. 64). Resistência à novobiocina, em concentração de 1,6 μ g/mL, foi observada por 40% das linhagens avaliadas, conforme resultados positivos apresentados por *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.lentus*, *S.sciuri*, *S.xylosus* e *S.xylosus*, ref. 10, 214, 44, 308, 141 e 335 (**Tabela 15**, p. 69). Apenas *S.cohnii*, ref. 366 e *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", apresentaram metabolismo nitidamente oxidativo e fermentativo (**Tabela 7**, p. 61). Por sua vez, susceptibilidade à lisostafina (25 μ g/mL) foi demonstrada por *S.caprae*, *S.chromogenes* e *S.lentus*, ref. 339, 146 e 44 (**Tabela 16**, p. 70).

Segundo relato de VALLE *et al* (1990), as linhagens teste foram classificadas de acordo com critérios propostos em 1980 e 1985, por DEVRIESE e colaboradores. Deste período até a época atual, muitas espécies e sub-espécies foram descritas ou realocadas, o que poderia justificar o não correlacionamento obtido pela análise adansoniana. Por outro lado, existe ainda uma inegável falta de hábito no trato da sistemática de estafilococos coagulase negativos, sobretudo em laboratórios voltados à microbiologia de alimentos. A restrição da aplicabilidade de conhecimentos sobre estas espécies pode ser explicada pelo fato de que enquanto poucos trabalhos atêm-se ao estudo classificatório destas, sobremaneira *S.aureus*, espécie coagulase positiva, vem sendo objeto de estudo, desde longa data,

a saber pelo seu papel confirmadamente patogênico, o que, sem dúvida alguma, destaca-o, como de maior vulto e importância, tanto em microbiologia humana como de alimentos.

5.2 - Da produção e quantificação de enterotoxinas pelas linhagens teste e *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", em meios de cultivo laboratorial

i - Fluidos sobrenadantes de cultura das linhagens teste e *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", obtidos a partir de cinco diferentes meios usados nos métodos de "membrana sobre ágar" e "saco de diálise" (**Figura 2**, p. 54), foram primeiramente testados para confirmação de resultados negativos no método de "OSP" (ROBBINS *et al*, 1974). Este ensaio apresenta sensibilidade somente até 0,5µg/mL não sendo, portanto, capaz de detectar quantidades diminutas (ng) de "SE". Tendo estas linhagens evidenciado resultados negativos, ficou confirmada a não produção de "SE", acima ou igual aos limites de 0,5µg/mL.

ii - Em relação à especificidade e sensibilidade do teste de "RPLA", através das informações contidas nas **Tabelas 17 e 18**, p. 73, é possível observar que este ensaio, quando conduzido com enterotoxina padrão dissolvida em solução tampão, apresentou-se compatível a cada "SE" avaliada, não apresentando, em nenhuma ocasião, reações inespecíficas anteriormente reportados por SHINGAKI *et al* (1981) e ODA *et al* (1985). Por sua vez, a menor quantidade de "SE" detectada foi de 0,625ng/mL para "SEA" e "SEC" e 1,250ng/mL para "SEB" e "SED". Os valores obtidos nesta pesquisa foram diversificados e, para "SEB" e "SEC", ligeiramente mais altos que aqueles relatados por PARK & SZABO (1986), que com o mesmo objetivo, encontraram valor único de 0,250ng/mL para "SEA", "SEB", "SEC" e "SED", homogeneidade esta, que pode ser explicada pelo fato de haverem trabalhado com enterotoxina purificada, o que não se deu neste experimento, onde se trabalhou com enterotoxina bruta. Para a leitura de resultados no ensaio de "RPLA", foram considerados positivos aqueles cujas zonas de aglutinação ocupavam cerca de 3/4, 1/2 e 1/4 do diâmetro do orifício da placa de microtítulo, o que permitiu a classificação 3+, 2+ e 1+, respectivamente; zonas de aglutinação iguais ou ligeiramente maiores que aquelas observadas no controle negativo foram classificadas com +/- e consideradas como resultados negativos.

Tabela 17 - Determinação de sensibilidade do método "RPLA", usando enterotoxina padrão de concentração conhecida*

"SE"	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Mínima quantidade detectável (ng/mL)
A	40	0,625
B	100	1,250
C	100	0,625
D	100	1,250

*Três repetições
"SE": enterotoxina estafilocócica padrão bruta, Toxin Technology, INC.
"RPLA", modificado a partir de IGARASHI *et al* (1986)

Tabela 18 - Determinação de especificidade do método "RPLA", usando enterotoxina padrão conhecida*

"RPLA" (solução de látex sensibilizado)	"SE" padrão			
	A	B	C	D
anti"SEA"	+	-	-	-
anti"SEB"	-	+	-	-
anti"SEC"	-	-	+	-
anti"SED"	-	-	-	+

*Três repetições
"RPLA", modificado a partir de IGARASHI *et al* (1986)
"SE": enterotoxina estafilocócica padrão bruta, Toxin Technology INC.
+, positivo
-, negativo

iii - Submetendo os fluidos sobrenadantes de culturas produzidos pelas 15 linhagens (14 linhagens teste mais a linhagem *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED") ao método "SET-RPLA", a conjectura inicial de que poderiam vir a ocorrer reações inespecíficas, apresentou-se como realidade. Isto foi observado também com o fluido de "SEB" controle, produzida em baixas quantidades pela linhagem padrão *S.aureus* S6. Não se verificou para "SEA" controle, produzida em quantidades usuais, pela mesma linhagem padrão *S.aureus* S6. A ocorrência destas reações, para as 15 linhagens, em 100% dos ensaios efetuados, impediu, de forma generalizada, a leitura de resultados (dado não constante em tabela).

As reações inespecíficas, no teste de "RPLA", manifestaram-se sob forma de "núvem", que se localizou nos orifícios inoculados com a amostra teste (Figura 4, p.75). Assim, na placa de microtítulo, elas se fizeram presentes, tanto no orifício adicionado de látex controle, como naquele adicionado de látex sensibilizado para "SE" específica. Tais reações impediram, desta forma, o entendimento ou leitura de resultado negativo ou resultado positivo, ficando, conseqüentemente, bloqueada a informação de presença ou ausência de "SE", para a amostra testada.

O procedimento empregado para eliminação destas reações não se mostrou eficaz (dados não constantes em tabelas) quando se utilizou o tratamento dos fluidos sobrenadantes de culturas pela adição de 2,5% de soro normal de carneiro, cavalo, coelho e novilho nem pelo tratamento térmico a 70°C, durante 2 minutos, porém, com a utilização destes tratamentos, PARK *et al* (1993) obtiveram resultados satisfatórios, embora tenha a pesquisa desse autor sido realizada com o método de "ELISA" e a partir de frutos do mar.

Contrariamente, a adição de solução a 5% (v/v) de IgG normal e purificada de coelho, em concentração de 0,74mg/ml, impediu a ocorrência de reações inespecíficas para a totalidade de amostras testadas (Figura 5, p. 76). Com este procedimento, não se observou a presença de resultados falso positivos já relatados para "SEB", quando detectada pelo método "RPLA", conforme reportado por FUJIKAWA & IGARASHI (1988). Comprovou-se nesta pesquisa, para a linhagem padrão *S.aureus* FRI-184, sabidamente não produtora de "SE" (controle negativo de produção), a obtenção exclusiva de resultados negativos para produção de enterotoxinas, quando testada com látex sensibilizados com antiA, antiB, antiC e antiD. Por outro lado, a adição de IgG normal e purificada de coelho também não provocou interferências nos resultados para baixas quantidades de "SEB" controle produzida pela linhagem padrão *S.aureus* S6. Verificou-se, porém, que, para esta mesma linhagem, quando testada para "SEA" controle, produzida em quantidades

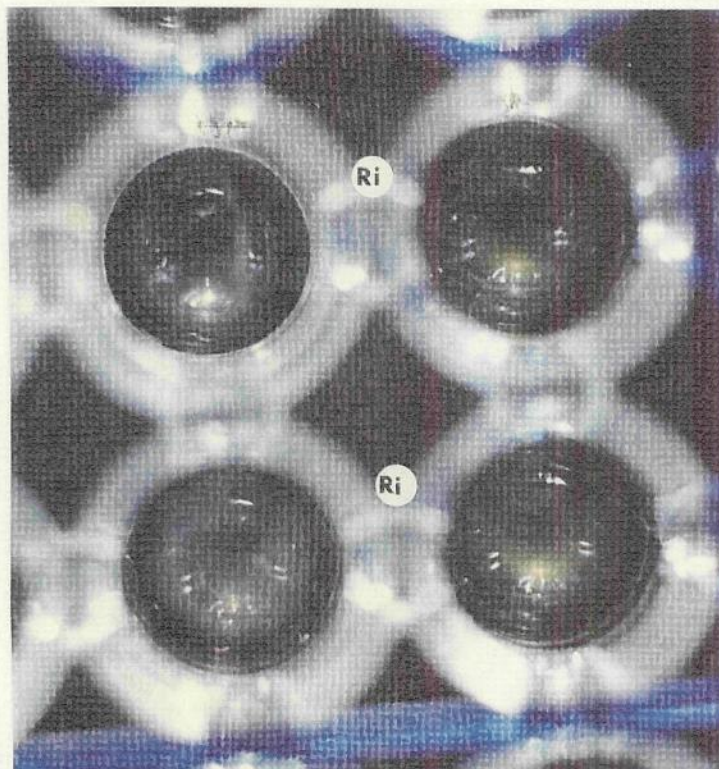
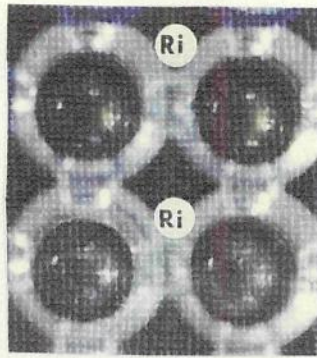


Figura 4 - Reações inespecíficas para fluidos sobrenadantes de culturas de linhagens teste usadas na pesquisa quando avaliadas por "RPLA", antes de tratamento com 5% de IgG normal e purificada de coelho

Ri: Reações inespecíficas (leitura de resultados impedidos pela presença de "núvem", em ambos orifícios da placa de microtítulo)

"RPLA", segundo IGARASHI *et al* (1986)

IgG normal de coelho, purificada segundo EY *et al* (1978)



Figura 5 - Resultados positivos e negativos para fluidos sobrenadantes de culturas das linhagens teste usadas na pesquisa quando avaliadas por "RPLA", após tratamento com 5% de IgG normal e purificada de coelho

P: Resultado positivo; leitura caracterizada por zona de aglutinação tipo 3+ e respectivo controle negativo visualizado por ponto róseo

N: Resultado negativo; leitura caracterizada por ponto róseo tanto para amostra teste como seu respectivo controle negativo

"RPLA", segundo IGARASHI *et al* (1986)

IgG normal de coelho, purificada segundo EY *et al* (1978)

usuais, sua inoculação em placa de microtítulo, na forma não diluída, forneceu resultados falso-negativos, possivelmente porque a quantidade de enterotoxina presente na amostra teste, não diluída, tivesse provocado, por seu teor, contato excessivo com o respectivo látex sensibilizado provocando, com isto, retração da zona de aglutinação.

Através de exercício continuado exigido no transcorrer desta pesquisa, constatou-se que, quando zonas de aglutinação alcançam cerca de $3/4$, $1/2$ e $1/4$ do diâmetro do orifício da placa de microtítulo (leitura de resultados classificados como 3+, 2+ e 1+), isso não vem a significar, conforme observações desta pesquisa, que, obrigatoriamente, para aquela amostra que apresentou por exemplo leitura 3+, seu conteúdo de "SE" seja superior ao daquela que demonstrou leitura 1+ e vice-versa. Esta situação ocorrida com "SEA" controle, produzida pela linhagem padrão S6, foi igualmente observada, ao longo do experimento, muitas vezes, também para as linhagens teste.

Trabalhando com fluidos sobrenadantes de linhagens produtoras usuais de "SE", pode-se inferir que a recomendação de se proceder à diluição inicial da amostra deve ser criteriosamente seguida. Atendo-se a uma alternativa oportuna, aquela que permite a revelação de linhagens pauciprodutoras, a utilização do método de "OSP" prima-se por excelência uma vez que, por si só, já selecionaria as linhagens produtoras usuais de "SE", restando para o teste de "RPLA", em uma segunda etapa de avaliação, somente aquelas que se mostraram negativas no primeiro ensaio. Esta estratégia, já foi adotada por PEREIRA *et al* (1995 e 1996ab), em pesquisas com linhagens vinculadas a portadores humanos, por apresentar, além de segurança nos resultados, economia para a viabilização dos mesmos, uma vez que se reduz sensivelmente o consumo de reagentes que compõem o "RPLA".

Em relação à eficácia da utilização de IgG normal e purificada de coelho no controle das reações inespecíficas observadas para as 14 linhagens teste, para *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED" e para "SEB" controle, produzida pelo padrão *S.aureus* S6, FOSTER & McDEVITT (1994) já haviam notificado que a proteína A funciona como um fator interativo na reação antígeno-anticorpo, sendo capaz de se ligar covalentemente à porção *fc* da molécula de IgG. Acrescenta-se a isto, o fato de a proteína A ser produzida por aproximadamente 98% das linhagens coagulase positivas de *Staphylococcus aureus* o que, neste caso, poderia justificar a ocorrência de reações inespecíficas para a linhagem *S. aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED" e *S.aureus* S6. Isto pode ser confirmado pelo estudo realizado por KOPER *et al* (1980), onde a interferência da proteína A foi completamente eliminada, quando em experimentos efetuados com o método de "ELISA", se utilizaram fragmentos $F(ab')_2$ da

molécula de IgG. Explicação contudo, para a exibição de reações inespecíficas pelas linhagens teste, 14 estirpes coagulase negativas, e seu controle efetivo pela adição de IgG normal e purificada de coelho, não se encontra à mão uma vez que, até o presente momento, não se dispõe de estudos sobre outro fator de interferência, além da proteína A.

As **Figuras 4 e 5**, p. 75 e 76, ilustram estes resultados, conforme observações de leituras de placas de microtítulo inoculadas pelo método "RPLA", em duas situações: presença de reações inespecíficas e ausência destas, após tratamento de fluidos sobrenadantes de cultura com solução de IgG normal e purificada de coelho.

Uma vez contornado o problema de reações inespecíficas observadas para os fluidos sobrenadantes de cultura das 14 linhagens teste, *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED" e "SEB" controle, produzida por *S.aureus* S6, o que representou, sem dúvida alguma, obstáculo de expressão para a realização do ensaio de "RPLA", pode-se dizer, conclusivamente, que este método não oferece maiores dificuldades: demanda apenas alguma prática e freqüência em seu manuseio, o suficiente para impossibilitar a aquisição de resultados subjetivos e cuidados excessivos, por parte do analista.

IV - Quanto à detecção e quantificação de enterotoxinas produzidas em condições de cultivo laboratorial, os resultados encontram-se dispostos nas **Tabelas 19, 20 e 21**, p. 79, 80, e 81. Estes dados informam que, para as linhagens teste produtoras de "SEB" (*S.warneri*, *S.haemolyticus*, *S.warneri* e *S.cohnii*, respectivamente ref. 14, 214, 224 e 366) e "SED" (*S.cohnii*, ref. 163 e 339), não ocorreu produção de enterotoxinas (**Tabelas 19, 20 e 21**, p. 79, 80 e 81, dados no rodapé), quando testadas por "RPLA", em ambas técnicas, "membrana sobre ágar" e "saco de diálise", seja este com 20 ou 10mL de solução tampão. Para *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", em iguais circunstâncias, não se obteve resultados positivos para a produção de enterotoxinas A, B, C, e D, o que não era de se esperar, sobretudo, em se considerando seu envolvimento provável em surto de intoxicação alimentar humana (dado não constante das tabelas).

Os resultados descritos na **Tabela 19**, p. 79, indicam uma tendência superior de produção para o procedimento "membrana sobre ágar", que permitiu 24 resultados positivos, com ênfase para os produtores de "SEA" (*S.cohnii* e *S.epidermidis*, ref. 10 e 366) e "SEC" (*S.cohnii*, *S.chromogenes*, *S.haemolyticus*, *S.hyicus*, *S.xylosus* e *S.xylosus*, ref. 366, 146, 107, 214, 129, 141 e 335). Quanto ao procedimento do "saco de diálise", preparado com 20mL (**Tabela 20**, p. 80), foram alcançados dez

Tabela 19 - Produção de enterotoxinas pelas linhagens teste usadas na pesquisa utilizando o método "membrana sobre agar"

Staphylococcus/ Referência		"SE"	Quantidade de "SE" produzida por ml				
			"BHI"-2x	"BHI"-2x-0.5	"TYE"	"Nz4"	"Nz6"
<i>cohnii</i>	366	A	-	0,625ng	0,625ng	-	0,625ng
<i>epidermidis</i>	10	A	-	0,625ng	-	-	-
<i>cohnii</i>	366	C	-	-	-	-	-
<i>chromogenes</i>	146	C	20ng	-	2,5ng	5ng	1,28µg
<i>haemolyticus</i>	107	C	-	-	-	5ng	-
<i>haemolyticus</i>	214	C	0,625ng	-	-	10ng	-
<i>hyicus</i>	129	C	40,96µg	81,92µg	81,92µg	655µg	2,56µg
<i>xylosus</i>	141	C	-	-	-	5ng	-
<i>xylosus</i>	335	C	10ng	-	2,5ng	10ng	160ng
<i>caprae</i>	163	E	-	0,625ng	-	-	-
<i>haemolyticus</i>	107	E	-	-	-	-	-
<i>lentus</i>	44	E	-	-	-	-	0,625ng
<i>scluri</i>	308	E	-	-	-	-	-
<i>xylosus</i>	335	E	-	-	-	-	0,625ng
Total			4	4	4	6	6

SE: enterotoxina estafilocócica

S. caprae (ref. 163 e 339); *S. warneri* (ref. 14 e 224); *S. haemolyticus* (ref. 214); *S. cohnii* (ref. 366) não produziram

"SED" e "SEB", respectivamente

Quantificação de "SE", conforme três repetições, por "RPLA", modificado a partir de IGARASHI *et al* (1986)

"BHI"-2x: infuso de cérebro e coração, "Brain heart infusion broth", "BHI", Biobrás, concentração dupla

"BHI"-2x-0.5: "BHI"-2x acrescido de 0.5% de extrato de levedura, "Yeast extract", "YE", Oxoid

"TYE": Tryptona, "Tryptone", Difco, a 3% acrescida de 1% de "YE"

"Nz4": Digestivo pancreático de caseína, "Nzamine A", "Nz", Sheffield Products, Norwich, NY", a 4% acrescido de

"YE" a 1%, 0.001% de L-arginine, Sigma Co. e 0.1% de KH₂PO₄, Merck

"Nz6": "Nz" a 6% acrescido de 1% de "YE"

Tabela 20 - Produção de enterotoxina pelas linhagens teste usadas na pesquisa utilizando o método do "saco de diálise" com 20mL de Na₂HPO₄ 0,01 M, em agitador a 180 rpm

Staphylococcus/ Referência		*SE*	Quantidade de "SE" produzida por mL				
			BHI-2x	*BHI*-2x-0.5	*TYE*	*Nz4*	*Nz6*
<i>cohnii</i>	366	A	-	-	-	-	-
<i>epidermidis</i>	10	A	-	-	-	-	-
<i>cohnii</i>	366	C	-	-	-	5ng	-
<i>chromogenes</i>	146	C	-	-	-	5ng	-
<i>haemolyticus</i>	107	C	-	-	-	-	-
<i>haemolyticus</i>	214	C	0,625ng	-	-	5ng	-
<i>hyicus</i>	129	C	-	-	20,48µg	40,96µg	81,92µg
<i>xylosus</i>	141	C	-	-	-	5ng	-
<i>xylosus</i>	335	C	-	-	-	5ng	-
<i>caprae</i>	163	E	-	-	-	-	-
<i>haemolyticus</i>	107	E	-	-	-	-	-
<i>lentus</i>	44	E	-	-	-	-	-
<i>scituri</i>	308	E	-	-	-	-	-
<i>xylosus</i>	335	E	0,625ng	-	-	-	-
Total:			2	0	1	6	1

SE: enterotoxina estafilocócica

S. caprae (ref. 163 e 339); *S. warneri* (ref. 14 e 224); *S. haemolyticus* (ref. 214); *S. cohnii* (ref. 366) não produziram

SED e *SEB*, respectivamente

Quantificação de "SE", conforme três repetições, por "RPLA", modificado a partir de IGARASHI *et al* (1986)

BHI-2x: Infuso de cérebro e coração, "Brain heart infusion broth", "BHI", Biobrás, concentração dupla

BHI-2x-0.5: *BHI*-2x acrescido de 0.5% de extrato de levedura, "Yeast extract", "YE", Oxoid

TYE: Triptona, "Triptone", Difco, a 3% acrescida de 1% de "YE"

Nz4: Digestivo pancreático de caseína, "Nzamine A", "Nz", Sheffield Products, Norwich, NY", a 4% acrescido de

"YE" a 1%, 0.001% de L-arginine, Sigma Co. e 0.1% de KH₂PO₄, Merck

Nz6: "Nz" a 6% acrescido de 1% de "YE"

Tabela 21 - Produção de enterotoxina pelas linhagens teste usadas na pesquisa utilizando o método do "saco de diálise" com 10mL de Na₂HPO₄ 0,01 M, em agitador a 180 rpm

Staphylococcus/ Referência		"SE"	Quantidade de "SE" produzida por mL				
			"BHI"-2x	"BHI"-2x-0.5	"TYE"	"Nz4"	"Nz6"
<i>cohnii</i>	366	A	-	0,625ng	-	-	-
<i>epidermidis</i>	10	A	-	-	-	-	-
<i>cohnii</i>	366	C	-	-	-	-	-
<i>chromogenes</i>	146	C	-	-	10ng	-	20ng
<i>haemolyticus</i>	107	C	-	-	-	-	-
<i>haemolyticus</i>	214	C	0,625ng	-	-	-	-
<i>hyicus</i>	129	C	-	1,25ng	1,25ng	-	1,25ng
<i>xylosus</i>	141	C	-	-	-	-	-
<i>xylosus</i>	335	C	-	-	-	-	-
<i>caprae</i>	163	E	-	1,25ng	-	-	-
<i>haemolyticus</i>	107	E	-	1,25ng	-	-	-
<i>lentus</i>	44	E	-	1,25ng	-	-	-
<i>soluri</i>	308	E	-	0,625ng	-	-	-
<i>xylosus</i>	335	E	-	1,25ng	-	-	-
Total			1	7	2	0	2

"SE": enterotoxina estafilocócica
S.caprae (ref. 163 e 339); *S.warneri* (ref. 14 e 224); *S.haemolyticus* (ref. 214); *S.cohnii* (ref. 366) não produziam "SED" e "SEB", respectivamente
 Quantificação de "SE", conforme três repetições, por "RPLA", modificado a partir de IGARASHI *et al* (1986)
 "BHI"-2x: Infuso de cérebro e coração, "Brain heart infusion broth", "BHI", Biobrás, concentração dupla
 "BHI"-2x-0.5: "BHI"-2x acrescido de 0.5% de extrato de levedura, "Yeast extract", "YE", Oxoid
 "TYE": Tryptona, "Tryptone", Difco, a 3% acrescida de 1% de "YE"
 "Nz4": Digestivo pancreático de caseína, "Nzamine A", "Nz", Sheffield Products, Norwich, NY, a 4% acrescido de "YE" a 1%, 0.001% de L-arginine, Sigma Co. e 0.1% de KH₂PO₄, Merck
 "Nz6": "Nz" a 6% acrescido de 1% de "YE"

resultados de produção de enterotoxina positiva, com clara tendência para "SEC", muito embora tenha atingido só 85,7% das sete linhagens teste amostradas. Já pelo procedimento utilizando 10mL de solução tampão (**Tabela 21**, p. 81), obteve-se produção total de "SEE" (*S.caprae*, *S.haemolyticus*, *S.lentus*, *S.sciuri* e *S.xyloxy*, ref. 163, 107, 44, 308 e 335) perfazendo 11 resultados de produção positiva de enterotoxinas.

Em trabalhos efetuados com *S.aureus*, baixo e usuais produtores de "SE", enfatiza-se, quase sempre, a melhor eficiência de crescimento e produção de "SE" pelo método do "saco de diálise", destacando-se a aeração e a continência em "sacos" como fatores preponderantes ao aumento de "SE" produzida, além de este método fornecer volume significativamente mais elevado de fluido sobrenadante de cultura, aproximadamente 14mL para 2mL (PEREIRA *et al*, 1990; SU & WONG, 1993). Esta metodologia requer, contudo, mais equipamentos e estrutura para sua realização, o que não ocorre com o método de "membrana sobre ágar" que pode, mais facilmente, ser executado em laboratórios tradicionais de microbiologia de alimentos. Entretanto, ao contrário do acima exposto, o que se verificou nesta pesquisa, foi a supremacia do método "membrana sobre ágar", possivelmente, pelo fato de este método utilizar-se de pequeno volume de diluente (2,5mL de solução tampão essenciais à lavagem do crescimento microbiano sobre a membrana), o que assegurou, possivelmente, insignificante diluição do conteúdo de "SE" produzida. Esta premissa, pensou-se poder ser também estendida ao método do "saco de diálise" conduzido com 10mL de solução tampão, em proporção 50% inferior ao procedimento usual de 20mL. Entretanto, neste caso, quase nula melhoria foi alcançada: 11 resultados positivos obtidos neste contra dez do procedimento normal, sinal indicativo de que o volume de 10mL então adotado, impõe ainda, nestas condições, grau excessivo de diluição.

Avaliando o desempenho individual dos meios de cultivo utilizados, "Nz4", "BHI"-2x-0,5 e "Nz6", sobressaem-se visivelmente (**Tabelas 19, 20 e 21**, p.79, 80 e 81). Ao primeiro recaí o somatório de doze, ao segundo onze e ao terceiro oito resultados de produção positiva. Tomando-se os resultados sob o prisma do procedimento utilizado, "Nz4", destaca-se no método do "saco de diálise" preparado com 20mL de tampão e "membrana sobre ágar" (**Tabelas 20 e 19**, p. 80 e 79); "BHI"-2x-0,5, no mesmo método "saco de diálise", com 10mL de solução tampão (**Tabela 21**, p. 81) e "Nz4" e "Nz6" apresentam o mesmo desempenho numérico no método "membrana sobre ágar" (**Tabela 19**, p. 79). A eficácia de meios com extrato pancreático de caseína digerida e o próprio "BHI", em concentrações e implementações diferenciadas já foi reportada, entre outros, por GOMEZ-LÚCIA *et al* (1989) e SU & WONG (1993), em pesquisas realizadas com linhagens pauciprodutoras de "SE".

Não se verificou a produção de enterotoxinas, nas condições adotadas neste experimento, pelas linhagens teste produtoras de "SEB" e "SED" (**Tabelas 19, 20 e 21**, p. 79, 80 e 81, em notas de rodapé), estendeu-se também para o procedimento de concentração com "PEG" 15-20000 (**Tabelas 22 e 23**, p. 84 e 85), quando seus fluidos sobrenadantes, especialmente produzidos em "BHI"-2x-0,5 e "Nz6", apresentaram-se negativos. Fato similar ocorreu com *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", que igualmente evidenciou ausência de produção, para ambos testes, "OSP" e "RPLA", após terem atingido valores médios de concentração que variaram de 45,0 até 64,0%. A técnica de concentração de fluidos, entre outros, tem sido levada a efeito quando se objetiva a concentração de "SE" produzida em baixas quantidades, viabilizando, após o tratamento, na maioria das vezes, sua detecção confirmatória pelo método de "OSP" (PEREIRA *et al*, 1990).

A comparação de dados obtidos sobre a quantidade de "SE" produzida pelas linhagens teste, tomando-se como base resultados originais de VALLE *et al* (1990) e aqueles desta pesquisa, de valores mais altos, selecionados do modelo experimental adotado, encontram-se sumarizados na **Tabela 24**, p. 86.

Conforme já considerado anteriormente, os resultados gerados por este experimento não contemplaram definitivamente, as linhagens produtoras de "SEB" e "SED", contrariamente, aos dados originais. Percebe-se, também, que as quantidades de enterotoxinas detectadas nesta pesquisa são, em sua maioria, inferiores aos dados reportados por VALLE *et al* (1990), não chegando a representar contudo, diferença significativa uma vez que as quantidades de enterotoxinas produzidas são efetivamente diminutas. Ressalta-se, entretanto, a expressiva produção de "SEC", para as linhagens *S.chromogenes*, *S.hyicus* e *S.xylosus* ref. 146, 129 e 335 que atingiu valores equivalentes a 1,28µg, 655µg e 160ng, respectivamente. Presumidamente, para as duas primeiras linhagens, *S.chromogenes* e *S.hyicus*, o desaparecimento da característica de linhagens pauciprodutoras de "SE", muito embora a tentativa de detecção destas enterotoxinas produzidas em concentrações elevadas, não tenha sido viabilizada pelo método de "OSP", conforme fornecimento de resultados negativos para "SEC" (dado não constante em tabela), permitindo-se pensar na possibilidade de se tratar de "SE" não identificada ou ainda, supostamente, na possibilidade de interferência de algum componente do meio de cultivo laboratorial, quando da pesquisa desta enterotoxina específica, através do ensaio "SET-RPLA". Observa-se, todavia, que os dados reportados por VALLE *et al* (1990) não definem, para estas, incluindo *S.caprae*, ref. 163, qual quantidade de "SEC" foi originariamente produzida, sendo marcado apenas o sinal (+), indicativo de suas presenças (**Tabela 24**, p. 86).

Tabela 22 - Produção de enterotoxina pelas linhagens teste usadas na pesquisa utilizando-se o método do "saco de diálise" com 20mL de Na₂HPO₄ 0,01 M, em agitador a 200rpm

<i>Staphylococcus/</i> Referência		"SE"	ng ou µg de "SE" produzida por mL	
			"BHI"-2x-0.5	"Nz6"
<i>caprae</i>	163	D	-	-
<i>caprae</i>	339	D	-	-
<i>aureus</i>	"FUNED"	?	-	-
<i>cohnii</i>	366	B	-	-
<i>haemolyticus</i>	214	B	-	-
<i>warneri</i>	14	B	-	-
<i>warneri</i>	224	B	-	-
<i>aureus</i>	"FUNED"	?	-	-

"SE": enterotoxina estafilocócia
 "BHI"-2x-0.5: Infuso de cérebro e coração, "Brain heart infusion broth", "BHI", Blobrás, concentração dupla, acrescido de 0.5% de extrato de levedura, "Yeast extract", "YE", Oxoid;
 "Nz6": Digestivo pancreático de caseína, "Nzamine A", "Nz", Sheffield Products, Norwich, NY" a 4% acrescido de 1% de "YE"
 ? : "SE" ausente ou desconhecida
 Quantificação de "SE", conforme três repetições, por "RPLA", modificado a partir de IGARASHI *et al* (1986)

Tabela 23 - Concentração de fluidos sobrenadantes de cultura das linhagens teste usadas na pesquisa com PEG15-20000

<i>Staphylococcus</i> / Referência		Meio	*SE* produzida (mL)		Concentração(%)	Detecção
			volume inicial	volume final		
<i>caprae</i>	163	*BHI*-2x-0.5	150,0	3,3	45,5	-
<i>caprae</i>	339		108,0	2,4	45,0	-
<i>aureus</i>	*FUNED*		164,0	3,0	54,7	-
<i>caprae</i>	163	*Nz6*	132,0	2,5	52,8	-
<i>caprae</i>	339		165,0	2,5	64,0	-
<i>aureus</i>	*FUNED*		164,0	3,0	54,7	-

SE: enterotoxina estafilocócica
PEG: Polietileno glicol, PM 15-20000, Sigma Chemical Co.
BHI-2x-0.5: infuso de cérebro e coração, "Brain heart infusion broth", "BHI", Biobrás, concentração dupla, acrescido de 0.5% de extrato de levedura, "Yeast extract", "YE", Oxoid
Nz6: Digestivo pancreático de caseína, "NZamine A", "Nz", Sheffield Products, Norwich, NY", a 4% acrescido de "YE" a 1%
SE produzida pelo método de "saço de diálise", com agitação a 200rpm
Detecção de "SE", conforme três repetições: "OSP", segundo ROBBINS *et al* (1974) e "RPLA", modificado a partir de IGARASHI *et al* (1986)

Tabela 24 - Comparação de dados de enterotoxina estafilocócica produzida a partir das linhagens teste usadas nesta pesquisa e os resultados originais de VALLE *et al* (1990)

<i>Staphylococcus</i> Referência		*SE*	Quantidade de *SE* produzida por mL	
			Dados de origem*	Dados desta pesquisa**
<i>cohnii</i>	366	A	2,2ng	0,625ng
<i>epidermidis</i>	10	A	4ng	0,625ng
<i>cohnii</i>	366	B	+	-
<i>haemolyticus</i>	214	B	2,5ng	-
<i>warneri</i>	14	B	3,6ng	-
<i>warneri</i>	224	B	7,6ng	-
<i>cohnii</i>	366	C	8,6ng	5ng
<i>chromogenes</i>	146	C	+	1,28µg
<i>haemolyticus</i>	107	C	3,9ng	5ng
<i>haemolyticus</i>	214	C	5,1ng	10ng
<i>hyleus</i>	129	C	+	655µg
<i>xylosus</i>	141	C	5,5ng	5ng
<i>xylosus</i>	335	C	9,1ng	160ng
<i>caprae</i>	163	D	9,3ng	-
<i>caprae</i>	339	D	1,4ng	-
<i>caprae</i>	163	E	+	1,25ng
<i>haemolyticus</i>	107	E	16,8ng	1,25ng
<i>lentus</i>	44	E	5,1ng	1,25ng
<i>sciuri</i>	308	E	3,8ng	0,625ng
<i>xylosus</i>	335	E	4,6ng	1,25ng

SE: enterotoxina estafilocócica

**SE* detectada por "ELISA, SET-EIA", segundo FEY & PFISTER (1983), resultados de VALLE *et al* (1990)

***SE* detectada por "RPLA", modificado a partir de IGARASHI *et al* (1986)

Analisando o conjunto de informações, consideradas sob o enfoque comparativo de melhor índice de produção, é necessário ter em mente que foram utilizados métodos diferentes para produção e detecção de "SE": os primeiros, dados de VALLE *et al* (1990), foram reportados para "BHI", pela técnica de "membrana sobre ágar", e detecção pelo ensaio de "ELISA, SET-EIA"; para dados desta pesquisa, empregaram-se, a partir de diferentes meios, os métodos de produção, "membrana sobre ágar" e "saco de diálise" com 20 e 10mL de solução tampão, e a detecção, por sua vez, foi levada a efeito pelo ensaio "SET-RPLA".

5.3 - Da inoculação, em alimentos, das linhagens teste e *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", procedente do surto

I - A prévia análise microbiológica dos alimentos, leite integral tipo "longa vida" e presunto cozido, demonstrou tratarem-se de substratos de qualidade compatível aos preceitos legais vigentes (Portaria 01, SNVS/MS de 28 de janeiro de 1987), apresentando estes, entre outros, nulo desenvolvimento de bactérias mesófilas e principalmente, ausência de estafilococos, nas condições amostradas e examinadas (dados não constantes em tabelas).

II - Os resultados sobre desenvolvimento e produção de enterotoxinas pelas linhagens teste e *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", em leite integral tipo "longa vida" e presunto cozido, experimentalmente inoculados, estão reportados nas **Tabelas 25 e 26**, p. 88 e 89, as tomadas de pH, em amostras de leite, após período de 24 e 48h de incubação, encontram-se na **Tabela 27**, p. 90.

O inóculo inicial para as linhagens teste e *S.aureus* sub-espécie *aureus* ref."FUNED" variou de $1,0 \times 10^4$ a $2,5 \times 10^4$ UFC/mL ou g, tanto para leite integral tipo "longa vida" como presunto cozido (**Tabelas 25 e 26**, p. 88 e 89). Estes valores podem ser considerados bastante uniformes tendo sido estipulado com o intuito de se atingir, após 24 e/ou 48h de incubação, densidade populacional compatível com aquela de 10^6 - 10^7 UFC/mL ou g, estimada como sendo a dose de células necessárias para produzir enterotoxina, em surtos relacionados com *S.aureus* (BERGDOLL, 1989).

Avallando-se primeiramente a **Tabela 25**, p. 88, que comporta dados relativos à inoculação em leite integral tipo "longa vida", pôde-se perceber que tal substrato apresentou, de maneira geral, condições adequadas ao desenvolvimento

Tabela 25 - Produção de enterotoxinas ("SE") em leite tipo "longa vida" inoculado com linhagens teste usadas na pesquisa e *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED" proveniente do surto*

Staphylococcus/ Referência	"SE"	Inóculo Inicial (UFC/mL)	Leite a 30°C (UFC/mL)			"SE" detectada por "ELISA"		
			0h		24h		48h	
cohnii epidermidis	366	A	1,6 x 10 ⁴		1,4 x 10 ⁸		3,4 x 10 ⁸	-
	10	A	1,4 x 10 ⁴		2,4 x 10 ⁸		7,9 x 10 ⁹	-
cohnii haemolyticus warneri warneri	366	B	1,6 x 10 ⁴		1,4 x 10 ⁸		3,4 x 10 ⁸	
	214	B	1,5 x 10 ⁴		1,5 x 10 ⁸		9,0 x 10 ⁸	-
	14	B	1,2 x 10 ⁴		1,9 x 10 ⁷		1,2 x 10 ⁸	-
	224	B	1,3 x 10 ⁴		3,0 x 10 ⁸		9,3 x 10 ⁸	-
cohnii chromogenes haemolyticus haemolyticus hyleus xylosum xylosum	366	C	1,6 x 10 ⁴		1,4 x 10 ⁸		3,4 x 10 ⁸	-
	146	C	1,7 x 10 ⁴		2,0 x 10 ⁸		4,5 x 10 ⁸	-
	107	C	1,5 x 10 ⁴		1,0 x 10 ⁸		2,5 x 10 ⁸	-
	214	C	1,5 x 10 ⁴		1,5 x 10 ⁸		9,0 x 10 ⁸	-
	129	C	2,0 x 10 ⁴		1,1 x 10 ⁶		1,2 x 10 ⁶	-
	141	C	1,0 x 10 ⁴		6,5 x 10 ⁷		4,6 x 10 ⁹	-
	335	C	1,3 x 10 ⁴		1,4 x 10 ⁷		1,3 x 10 ⁸	-
caprae caprae	163	D	1,1 x 10 ⁴		1,2 x 10 ⁸		4,6 x 10 ⁸	-
	339	D	1,8 x 10 ⁴		4,5 x 10 ⁷		7,6 x 10 ⁸	-
caprae haemolyticus lentus scluri xylosum	163	E	1,2 x 10 ⁴		1,2 x 10 ⁸		4,6 x 10 ⁸	-
	107	E	1,5 x 10 ⁴		1,0 x 10 ⁸		2,5 x 10 ⁸	-
	44	E	1,3 x 10 ⁴		5,1 x 10 ⁷		4,6 x 10 ⁷	-
	308	E	1,8 x 10 ⁴		Nhc		Nhc	
	335	E	1,3 x 10 ⁴		1,4 x 10 ⁷		1,3 x 10 ⁸	-
aureus	"FUNED" ?	2,5 x 10 ⁴			4,0 x 10 ⁷		3,9 x 10 ⁹	"SED"

*Duas repetições; UFC: Unidade Formadora de Colônia; "ELISA, SET-ELISA" ; ? "SE" desconhecida; Nhc: Não houve crescimento.

Tabela 26 - Produção de enterotoxinas ("SE") em presunto cozido inoculado com linhagens teste usadas na pesquisa e *S. aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED" proveniente do surto*

Staphylococcus / Referência	"SE"	Inóculo inicial (UFC/mL)		Presunto a 30°C (UFC/mL)		"SE" detectada por "ELISA/RPLA"	
		0h		24h	48h	24h	48h
cohnii epidermidis	366 10	A	1,6 x 10 ⁴ 1,4 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁸ 5,0 x 10 ⁶	7,4 x 10 ⁸ 2,3 x 10 ⁸	-/- -/-	-/- -/-
cohnii haemolyticus warneri warneri	366 214 14 224	B B B B	1,6 x 10 ⁴ 1,1 x 10 ⁴ 1,2 x 10 ⁴ 1,3 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁸ 6,0 x 10 ⁶ 2,2 x 10 ⁸ 1,1 x 10 ⁸	7,4 x 10 ⁸ 7,7 x 10 ⁸ 5,6 x 10 ⁸ 6,5 x 10 ⁸	-/- -/- -/- -/-	-/- -/- -/- -/-
cohnii chromogenes haemolyticus haemolyticus hyicus xylosus xylosus	366 146 107 214 129 141 335	C C C C C C C	1,6 x 10 ⁴ 1,7 x 10 ⁴ 1,5 x 10 ⁴ 1,1 x 10 ⁴ 2,0 x 10 ⁴ 1,0 x 10 ⁴ 1,3 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁸ 5,9 x 10 ⁸ 3,2 x 10 ⁸ 6,0 x 10 ⁶ 4,2 x 10 ⁶ 9,3 x 10 ⁷ 2,6 x 10 ⁷	7,4 x 10 ⁸ 3,2 x 10 ⁹ 3,1 x 10 ⁹ 7,7 x 10 ⁸ 6,5 x 10 ⁶ 4,6 x 10 ⁹ 2,3 x 10 ⁸	-/- -/- -/- -/- -/- -/- -/-	-/- -/- -/- -/- -/- -/- -/-
caprae caprae	163 339	D D	1,1 x 10 ⁴ 1,2 x 10 ⁴	3,0 x 10 ⁷ 1,0 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁸ 6,6 x 10 ⁸	-/- -/-	-/- -/-
caprae haemolyticus lentus scluri xylosus	163 107 44 308 335	E E E E E	1,1 x 10 ⁴ 1,5 x 10 ⁴ 1,3 x 10 ⁴ 1,8 x 10 ⁴ 1,3 x 10 ⁴	3,0 x 10 ⁷ 3,2 x 10 ⁸ 4,1 x 10 ⁷ 6,6 x 10 ⁶ 2,6 x 10 ⁷	1,4 x 10 ⁸ 3,1 x 10 ⁹ 1,1 x 10 ⁸ 7,2 x 10 ⁶ 2,3 x 10 ⁸	-/- -/- -/- -/- -/-	-/- -/- -/- -/- -/-
aureus	"FUNED" ?	?	2,5 x 10 ⁴	8,1 x 10 ⁸	6,5 x 10 ⁹	"SED" /- "	"SED" /- "

*Duas repetições; UFC: Unidade Formadora de Colônia; "ELISA, SET-EIA"; ?; "SE" desconhecida; - negativo

Tabela 27 - pH em leite tipo "longa vida" inoculado com as linhagens teste usadas na pesquisa e *S.aureus* sub-espécie *aureus*, referência "FUNED" procedente do surto

<i>Staphylococcus</i>	Referência	Leitura de pH		
		0h	24h	48h
<i>aureus</i>	"FUNED"	6,60	6,48	5,71
<i>caprae</i>	163	6,59	6,49	6,13
<i>caprae</i>	339	6,59	6,62	6,43
<i>chromogenes</i>	146	6,69	6,60	6,27
<i>cohnii</i>	366	6,80	6,60	6,54
<i>epidermidis</i>	10	6,60	6,50	6,43
<i>haemolyticus</i>	107	6,70	6,62	6,37
<i>haemolyticus</i>	214	6,70	6,66	6,40
<i>hyleus</i>	129	6,60	6,36	5,00
<i>lentus</i>	44	6,63	5,82	5,39
<i>sciuri</i>	308	6,63	5,95	5,39
<i>warneri</i>	14	6,70	6,64	5,31
<i>warneri</i>	224	6,71	6,57	6,80
<i>xylosus</i>	141	6,80	6,75	6,80
<i>xylosus</i>	335	6,82	6,70	6,61

Faixa de inóculo bacteriano: 1,0 - 2,5 x 10⁴ UFC/mL

das linhagens testadas das quais, a partir de 10^4 UFC/mL (tempo zero), sete (*S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus* e *S. caprae*, ref. 366, 10, 224, 146, 107, 214, 163) tiveram sua população elevada para 10^8 , cinco (*S. warneri*, *S. xyloso*, *S. xyloso*, *S. caprae* e *S. lentus*, ref. 14, 141, 335, 339 e 44) para 10^7 e uma (*S. hyicus*, ref. 129) para 10^6 UFC/mL, no período de 24h de incubação, tendo cerca de 73% das linhagens atingido, em 48h, população igual a 10^8 UFC/mL. Exceção se faz, para *S. sciuri*, ref. 308, que apresentou ausência de desenvolvimento após inoculação, nos dois períodos de tempo estudados. Por sua vez, *S. hyicus*, ref. 129, limitou-se ao desenvolvimento de 10^6 UFC/mL e o máximo desenvolvimento, 10^9 UFC/mL, foi alcançado por *S. xyloso*, ref. 141, e *S. aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED".

Quanto a produção de enterotoxinas (**Tabela 25**, p. 88), estas se fizeram ausentes, até o período de 48h, para todas as linhagens teste, sem exceção, fato também observado para *S. chromogenes*, *S. hyicus* e *S. xyloso*, ref. 146, 129 e 335 que tiveram produção expressiva em condições de cultivo laboratorial (**Tabela 19**, p. 79). Buscando-se uma explicação para a não ocorrência de produção de "SE" nestas condições, para estas três linhagens em especial, a avaliação de alteração de pH no substrato pesquisado poderia ser indicativa de que, somente para *S. hyicus*, ref. 129, este fator pudesse ter vindo a funcionar como inibidor ao crescimento celular, uma vez que o potencial hidrogeniônico, com um valor médio aproximado de 6,8, para o leite integral tipo "longa vida", no momento da inoculação, decresceu para 5,0, após 48h de permanência a 30°C (**Tabela 27**, p. 90). Todavia, valores de pH próximos a este, 5,31 e 5,71, foram relatados para o mesmo substrato inoculado, nas mesmas condições, com *S. warneri*, ref. 14 e *S. aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", respectivamente, mas que apresentaram desenvolvimento situado na faixa de 10^8 UFC/mL.

De acordo com resultados da **Tabela 26**, p. 89, ainda sob o enfoque da avaliação de contagem de células inoculadas, desta feita em presunto cozido, observou-se, para o período de incubação de 24h, leitura um pouco inferior àquela obtida em leite integral tipo "longa vida". No presente, seis linhagens (*S. cohnii*, *S. warneri*, *S. warneri*, *S. chromogenes* e *S. haemolyticus*, ref. 366, 14, 224, 146 e 107) tiveram sua densidade populacional elevada para 10^8 , quatro (*S. xyloso*, *S. xyloso*, *S. caprae* e *S. lentus*, ref. 141, 335, 163 e 44) para 10^7 e quatro (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus* e *S. caprae*, ref. 10, 214, 129 e 339) para 10^6 UFC/g de presunto cozido. Entretanto, decorrido o tempo de 48h de incubação, aproximadamente, 20%, 66% e 13% destas linhagens atingiram densidade populacional de 10^6 , 10^8 e 10^9 UFC/g, respectivamente, valores estes, superiores àqueles reportados para o leite integral

tipo "longa vida", neste mesmo período de incubação. A linhagem teste, *S.sciuri*, ref. 308, desenvolveu-se, o que não ocorreu em leite integral tipo "longa vida", como se vê na **Tabela 25**, p. 88, atingindo 10^6 UFC/g, índice este, novamente, não ultrapassado por *S.hyicus*, ref. 129 (**Tabela 26**, p. 89).

A única produção de enterotoxina observada recaiu para *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", que, contrariamente ao reportado em condições de cultivo laboratorial, pelo método de "RPLA" (dado não constante em tabela), apresentou resultados negativos para produção de "SEA", "SEB" e "SEC" mas, mostrou-se produtor de "SED", pelo método de "ELISA, SET-EIA", tanto em leite integral tipo "longa vida" como presunto cozido (**Tabelas 25 e 26**, p. 88 e 89).

Todas as amostras inoculadas com presunto cozido, em virtude do fornecimento de extrato límpido e bastante transparente, puderam, em paralelo, ser submetidas à análise por ambos métodos, "RPLA" e "ELISA, SET-EIA", sendo observados os mesmos resultados negativos para produção de "SE" (**Tabela 26**, p. 89), em ambos ensaios, quando do estudo das linhagens teste. Acontecimento este, que, similarmente ao resultado relatado para leite integral tipo "longa vida", para *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", demonstrou, pelo ensaio de "RPLA", resultado negativo para "SE" e resultado positivo, indicativo da presença de "SED", por "ELISA, SET-EIA" (**Tabelas 25 e 26**, p. 88 e 89).

A não produção de "SE" pelas linhagens teste *S.chromogenes*, *S.hyicus* e *S.xylosus*, ref. 146, 129 e 335, em alimentos contrariamente ao que ocorreu em condições de cultivo laboratorial e ainda a discrepância de resultados fornecidos por *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", justificaram a seleção destas linhagens para estudo mais amplo. Submeteram-se as amostras, após quelagem a cobre, à cromatografia de imunoafinidade. Este procedimento foi debalde conduzido, pois, uma vez efetuada a concentração de seus extratos a partir de leite integral tipo "longa vida" e presunto cozido, não se obtiveram resultados positivos para produção de "SE", pelo método de "RPLA", confirmando-se, desta forma, o idêntico resultado obtido pelo método de "ELISA, SET-EIA", para estas linhagens teste. Similarmente, após este tratamento, permaneceram divergentes os resultados para *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", outra vez positivo para "SED", no ensaio de "ELISA, SET-EIA" e outra vez negativo no ensaio de "RPLA".

Faz-se necessário comentar que através de ensaio piloto conduzido para validação deste procedimento de concentração por cromatografia de afinidade usando cobre quelado à amostra, mostrou-se plenamente eficaz para amostra de queijo tipo "Minas", sabidamente não enterotoxigênica, recuperando-se

as quantidades de 10 e 1ng de "SEA" experimentalmente adicionadas (dados não constantes em tabela). Pôde-se perceber que este procedimento, além do efeito de concentração da amostra em até 20 vezes, conseguiu viabilizar a detecção de "SE" pelo método de "RPLA", pela clareza e limpidez dos extratos alimentícios então fornecidos.

Considerando a ausência de trabalhos que versam sobre a tentativa de se promover, em modelos experimentais, o desenvolvimento e produção de enterotoxinas, tomando-se como referência espécies coagulase negativas, torna-se inexequível uma discussão mais ampla. Os resultados ora produzidos, alicerçaram o crescimento de 93,3% das linhagens teste - *S. caprae*, ref. 163 e 339; *S. chromogenes*, ref. 146; *S. cohnii*, ref. 366; *S. epidermidis*, ref. 10; *S. haemolyticus*, ref. 107 e 214; *S. hyicus*, ref. 129; *S. lentus*, ref. 44; *S. xylosum*, ref. 141 e 335 e *S. warnerii*, ref. 14 224 - em leite tipo "longa vida" e presunto cozido, mas, ausência de enterotoxina que pudesse ter sido detectada, mesmo após concentração por cromatografia de imunoafinidade, por "ELISA, SET-EIA" e "RPLA". O fato de estas linhagens produzirem, em condições de cultivo laboratorial, diminutas quantidades de "SE" e efetivamente não as terem produzido nos dois substratos alimentícios adotados nesta pesquisa poderia ser indicativo de que as linhagens teste, espécies coagulase negativas, não desempenham papel como patógenos de alimentos. No que diz respeito às linhagens teste, *S. hyicus*, *S. chromogenes* e *S. xylosum*, ref. 129, 146 e 335, que produziram, em condições de cultivo laboratorial, expressivo teor de "SEC", far-se-á oportuna e plausível a execução de mais experimentos, dando-se ênfase à possibilidade de interferência de outra substância, não obrigatoriamente enterotoxina, que, de forma cruzada, interage com o látex sensibilizado com anti"SEC", no ensaio de "RPLA".

5.4 - Do histórico à elucidação do surto de intoxicação humana

Sobras de queijo tipo "Minas", semi-curado, aproximadamente 300g foram casualmente encaminhadas ao Laboratório de *Staphylococcus*, Serviço de Microbiologia, Divisão de Bromatologia e Toxicologia da Fundação Ezequiel Dias, em março de 1993, como suspeita de causar intoxicação alimentar humana. Efetuando-se entrevista com o portador do alimento, pessoa também acometida, com vistas à elucidação epidemiológica do surto, pôde-se observar que a sintomatologia apresentada pelos envolvidos enfatizava a possibilidade de ser enterotoxina estafilocócica, o agente causal, em primeira estância. Conduzindo-se a pesquisa de

células viáveis no produto suspeito foi evidenciado número significativo de estafilococos que se fazia presente na amostra de queijo analisado. Os dados relativos à contagem destes microrganismos e outros aspectos epidemiológicos do surto encontram-se reportados na **Tabela 28**, p. 95. As **Figuras 6, 7, 8, e 9**, p. 96, 97, 98 e 99 proporcionam a visualização de alguns caracteres bioquímicos (produção de nuclease e termonuclease; lise de hemácias de sangue de carneiro e características de crescimento) evidenciados pela linhagem envolvida no surto tendo esta, através do estudo taxonômico, sido identificada como *Staphylococcus aureus* sub-espécie *aureus* que, em função da procedência, foi referenciada "FUNED".

A imagem comportamental em ágar "BP" (**Figura 10**, p. 100), demonstra, de pronto, a presença de colônias que poderiam ter sido rejeitadas em função do desenvolvimento atípico, caracterizado por ausência de halo de lecitinase e halo de lipase, que, via de regra, acompanham *S. aureus*, sobremaneira aqueles envolvidos em surtos.

Tendo os resultados da pesquisa de enterotoxina, a partir da amostra suspeita de queijo, oferecido resultado positivo para "SED", pelo método de "ELISA, SET-EIA" e, a partir de fluidos sobrenadantes da cultura de *Staphylococcus aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", detectada a partir do queijo em questão, demonstrado resultado negativo, pelo método de "OSP", para esta mesma enterotoxina, pôde-se supor, prontamente, tratar-se de linhagem que produzia quantidades inferiores a 0,5ng de "SE"/g, não detectável, portanto, por este último método. Esta premissa, realmente plausível, conferia ao *Staphylococcus aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", características de linhagem pauciprodutora, informação esta que se impôs, pelo perfil de similaridade às linhagens teste, produtoras de baixas quantidades de "SE", propiciando seu ajuntamento à estas, dentro do objetivo primário desta pesquisa.

A inusitada e, até então, inexplicável discordância de resultados somados ao longo da pesquisa de elucidação do surto, foi, finalmente, esclarecida quando, em uma última tentativa, foram obtidos resultados negativos, para produção de "SED", pelo método de "ELISA-RIDASCREEN" (**Tabela 29**, p. 101), que se utiliza de anticorpos monoclonais, em testes com fluido sobrenadante de cultura e extrato concentrado do queijo incriminado, muito embora, resultado positivo para "SED" (**Tabela 30**, p. 102), a partir destes mesmos substratos, após neutralização com anti"SED", pelo método de "ELISA, SET-EIA", fizeram-se ainda, insistentemente observados. Faz-se oportuno relatar que o fluido sobrenadante de cultura da linhagem controle *S. aureus* FRI-472, produtora exclusiva de "SED" (dado não constante em tabela), demonstrou após neutralização com anti"SED" resultado

Tabela 28 - Perfil epidemiológico do surto de intoxicação alimentar humana ocorrido em Belo Horizonte, MG

Alimento envolvido	Contagem de estafilococos	Pessoas acometidas	Caso de internação hospitalar	Período médio de incubação	Sintomas apresentados
	(UFC/g)	(nº)	(nº)	(h)	
Queijo tipo "Minas" semi-curado	2,9 x 10 ⁸	07	01	04	Diarréia, vômito prostração e dores abdominais

UFC: Unidade Formadora de Colônia

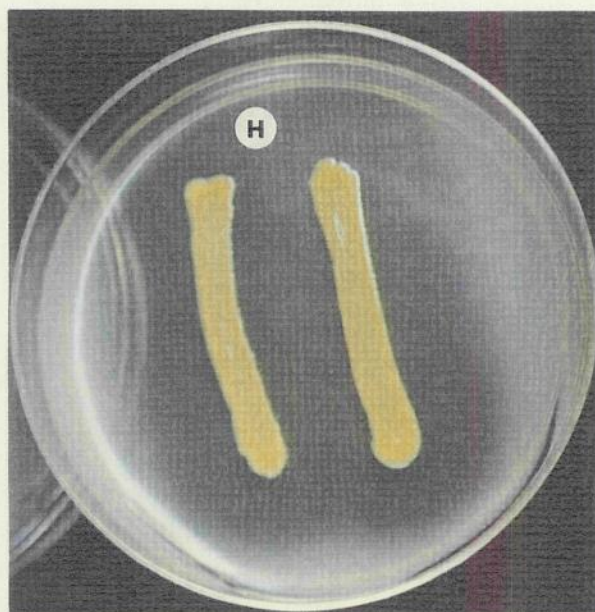


Figura 6 - Resultado positivo para produção de nuclease (DNase), em ágar DNA inoculado com *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", procedente do surto

H: Resultado positivo, caracterizado por halo transparente circundando as duas estrias amarelas de inoculação



Figura 7 - Resultado positivo para produção de termonuclease (TNase), em ágar azul de O-toluidina-DNA inoculado com *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", procedente do surto

H: Resultado positivo, caracterizado por halo róseo circundando os dois orifícios de inoculação

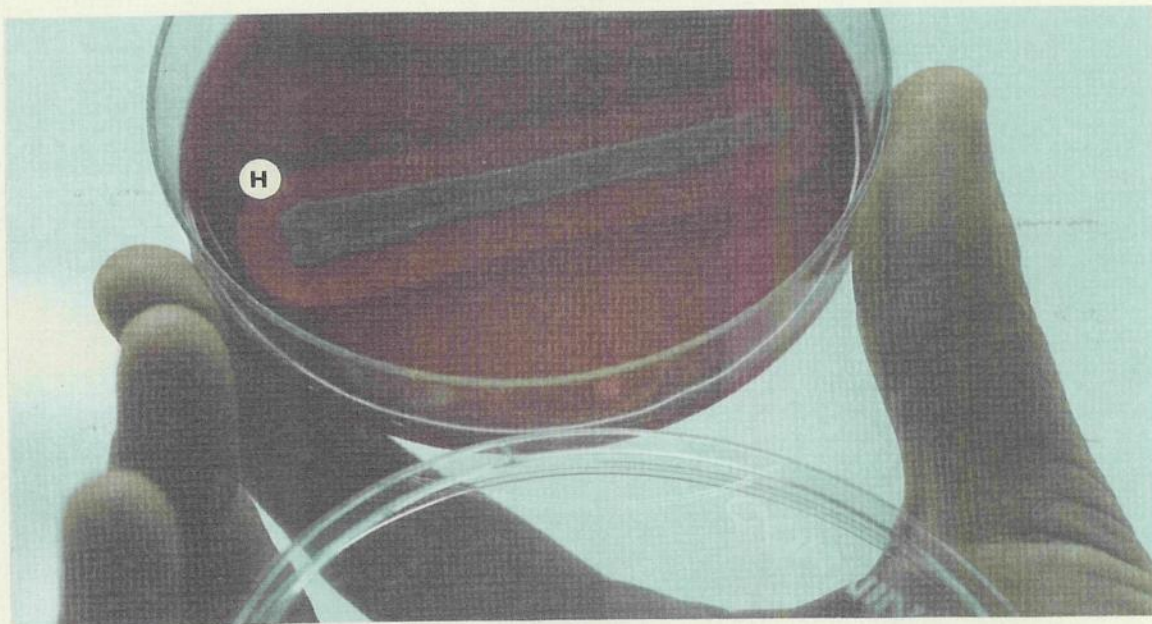


Figura 8 - Hemólise em ágar sangue de carneiro inoculado com *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", procedente do surto

H: Resultado positivo, caracterizado por halo transparente circundando a estria de Inóculo

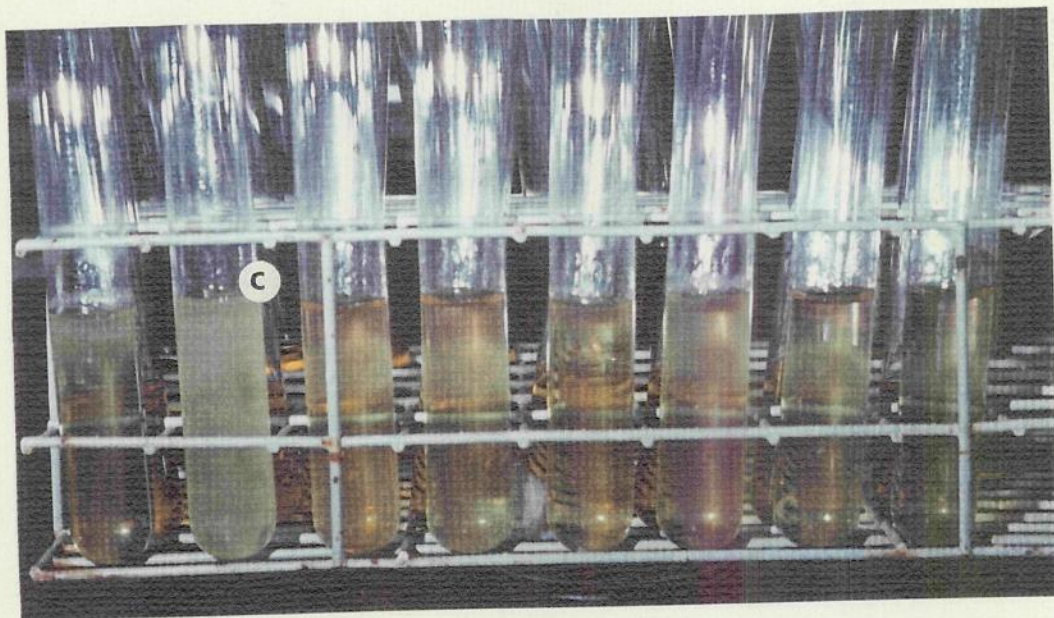


Figura 9 - Crescimento de *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", procedente do surto, em meio fluido de tioglicolato de sódio

C: Crescimento distribuído ao longo do tubo, caracterizando metabolismo aeróbio e anaeróbio



Figura 10 - Comportamento, em ágar "BP", de *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", procedente do surto

Ágar "BP": ágar Baird Parker

C: Colônias negras, brilhantes e desprovidas de halos de lecitinase e lipase

Tabela 29 - Produção de enterotoxina estafilocócica a partir do extrato concentrado de queijo envolvido no surto e fluido sobrenadante de *Staphylococcus aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", neste detectada

Substrato	Pesquisa de "SE"			
	"OSP"	"SET-RPLA"	"ELISA, SET-EIA"	"ELISA, RIDASCREEN"
			(policlinal)	(monoclonal)
Fluido sobrenadante de cultura*	-	-	"SED"	-
Extrato concentrado de queijo**	Nr	-	"SED"	-

"SE": enterotoxina estafilocócica

*Fluido sobrenadante: "pool" preparado a partir de "BHI"-2x0.5 (infuso de cérebro e coração,

"Brain heart infusion broth, "BHI", Biobrás, concentração dupla, acrescido de 0.5% de extrato de levedura, "Yeast extract, YE", Oxoid) e "Nzô" (Digestivo pancreático de caseína, "Nizamine A",

"Nz", Sheffield Products, Norwich, NY), a 6% acrescido de "YE" a 1%) produzido pelos métodos de "saco de diálise" com 20ml de solução tampão, com agitação a 180rpm e "membrana sobre ágar"

** Concentração por cromatografia de afinidade, segundo DICKIE & AHKTAR (1989)

"OSP", segundo ROBBINS *et al* (1974)

"RPLA", segundo IGARASHI *et al* (1986)

"ELISA, SET-EIA", segundo FEY & PFISTER (1983)

"ELISA, RIDASCREEN", segundo PARK *et al* (1994)

Nr: não realizado

-: negativo

Tabela 30 - Confirmação da produção de enterotoxina estafilocócica a partir de extrato concentrado de queijo envolvido no surto e fluido sobrenadante de *Staphylococcus aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", neste detectada

Fluido sobrenadante de cultura e extrato concentrado de queijo*	Confirmação de "SED"	
	"ELISA, SET-EIA" (policlonal)	"ELISA, RIDASCREEN" (monoclonal)
Amostras não neutralizadas	+	-
Amostras neutralizadas com anti"SED"	+	-

"SED": enterotoxina estafilocócica tipo D
 *Fluido sobrenadante: "pool" preparado a partir de "BHI"-2x-0.5 (Infuso de cérebro e coração, "Brain heartth infusion broth, "BHI", Biobrás, concentração dupla, acrescido de 0.5% de extrato de levedura, "Yeast extract, YE", Oxoid) e: "Nz6"(Digestivo pancreático de caseína, "NZamine A", "Nz", Sheffield Products, Norwich, NY", a 6% acrescido de "YE" a 1%), produzido pelos métodos de "saco de diálise" com 20mL de solução tampão, com agitação a 180rpm e "membrana sobre água"
 ** Concentração por cromatografia de afinidade, segundo DICKIE & AHKTAR (1989)
 "ELISA, SET-EIA", segundo FEY & PFISTER (1983)
 "ELISA, RIDASCREEN", segundo PARK *et al* (1994)
 +: positivo
 -: negativo

negativo quando testada pelo método de "ELISA, SET-EIA", que se utiliza de anticorpos policlonais, evidenciando positivamente a eficácia deste instrumento de análise. A **Figura 11**, p. 104, para maior fluidez de entendimento dos dizeres e dados acima expostos, ilustra com a presença de cor amarela indicativa de resultado positivo para "SED", no ensaio de "ELISA, SET-EIA", observada em ambos tubos que contêm fluido sobrenadante de *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", antes e após neutralização com anti"SED".

Ficando assim confirmado resultado positivo para "SED", em fluido sobrenadante de cultura, sem e com neutralização com a respectiva antitoxina D, exclusivamente, quando testadas pelo método de "ELISA, SET-EIA" (**Figura 11**, p. 104) e se confirmando resultado negativo para a linhagem controle *S.aureus* FRI-472, exclusiva produtora de "SED", após mesma neutralização, ensalada pelo mesmo método (dado não constante em tabela) depreendeu-se que a linhagem *Staphylococcus aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", procedente do queijo envolvido, bem como a linhagem padrão *S.aureus* 1151M, utilizada na produção de anticorpos policlonais inerente ao conjunto de reagentes de "ELISA, SET-EIA", produziam ambas, enterotoxina comum, ainda não identificada.

Esta hipótese, finalmente, foi confirmada através de testes realizados por pesquisadores do "FRI", University of Wisconsin, USA - Yi-Cheng Su e Amy C. L. Wong⁴ - em outubro de 1994, quando estes, ainda trabalhando na purificação da recém descoberta "SEH" (SU & WONG, 1995), testaram, a pedido, o fluido sobrenadante de *Staphylococcus aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", produzido em "Nzô", pelo método do "saco de diálise", usando 20mL de solução tampão, contra anti"SEH", reagente este, não disponível comercialmente. Os testes efetuados por estes pesquisadores evidenciaram a produção de 180ng/mL de "SEH" no fluido sobrenadante de *Staphylococcus aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED" e, ainda, a produção desta mesma enterotoxina, conforme suposição levantada nesta pesquisa, pela linhagem padrão *S.aureus* 1151M a saber, concomitantemente produtora de "SED" e "SEH" e utilizada na produção de "SED" e respectivos anticorpos policlonais para o conjunto de reagentes do "ELISA, SET-EIA".

Este surto enfatiza a importância de *S.aureus*, enquanto linhagem pauciprodutora de "SE" que, até o presente momento, só tinha sua participação vinculada a intoxicação alimentar no episódio descrito por EVENSON *et al* (1988). Este último episódio, teve lugar em uma instituição educacional nos Estados Unidos, como resultado da ingestão, por crianças, de leite achocolatado que continha 0,4-0,7ng/mL de "SEA".

⁴Yi-Cheng Su e Amy C. L. Wong, Department of Food Toxicology, Food Research Institut, University of Wisconsin, Madison 1925 Willow Drive, Madison, Wisconsin, 53706

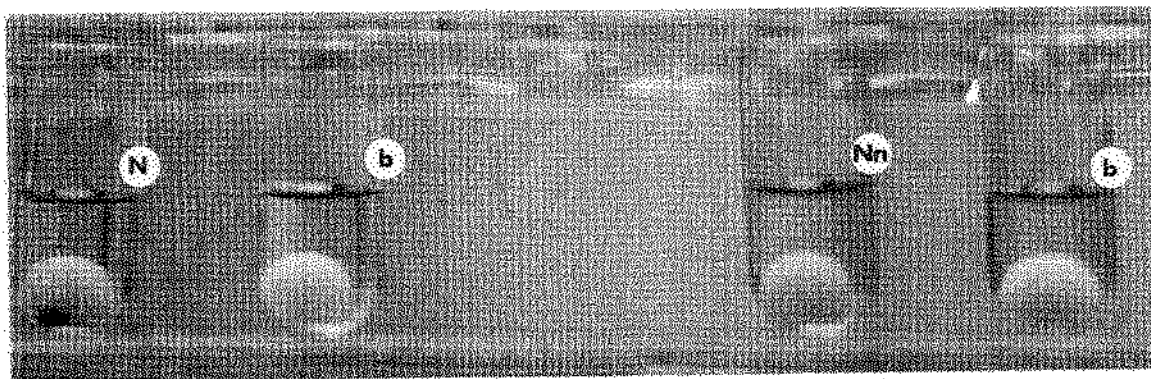


Figura 11 - Confirmação de produção de enterotoxina estafilocócica não identificada, pelo método de "ELISA, SET-EIA" a partir de fluido sobrenadante de cultura de *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", procedente do surto, após neutralização e não neutralização com anti"SED"

N: Presença de cor amarela; resultado positivo para "SED", em amostra previamente neutralizada com anti"SED"

Nn: Presença de cor amarela; resultado positivo para "SED", em amostra não neutralizada com anti"SED"

b: branco

"SED": enterotoxina estafilocócica tipo D

"ELISA, SET-EIA", segundo FEY & PFISTER (1983)

Fica também fortificado o conceito de que, conforme igualmente observado no relato de EVENSON *et al* (1988), em se usando apenas os métodos tradicionais de detecção de "SE", como "OSP", isoladamente, sem a participação de técnicas imunológicas finas como "SET-RPLA", "ELISA, SET-EIA" e "ELISA-RIDASCREEN", o surto elucidado nesta pesquisa teria, certamente, escapado ao alcance de estudo mais contundente, em decorrência da grosseira sensibilidade do método "OSP" que, contudo, com excelência se presta, para avaliação de linhagens produtoras usuais de "SE".

Entre os métodos imunológicos finos, na particular situação concernente a este surto envolvendo queijo tipo "Minas", impõe-se ressaltar a acuidade e especificidade demonstrada pelos métodos "SET-RPLA" e "ELISA-RIDASCREEN", o primeiro preparado com anticorpos purificados por cromatografia de afinidade e o segundo produzido a partir de anticorpos de captura monovalente, tecnologia de produção esta que ofereceu, segurança e reprodutibilidade aos resultados, propiciando caminhos para o destrinchamento analítico e permitindo, conseqüentemente, alternativas para a elucidação do episódio em questão.

Quanto ao método de "ELISA-SET-EIA" não se deve desmerecê-lo, pois, apesar de se haver mostrado pouco específico, em função do fornecimento de reações cruzadas para "SED" e "SEH", mostrou-se prático e funcional, sobretudo, em função da simplicidade de preparo do substrato alimentício e seu manuseio, quando da pesquisa direta de enterotoxinas, em alimentos.

Com base no estudo efetuado, tornou-se lícito concluir que o surto de intoxicação humana, envolvendo queijo tipo "Minas", em Belo Horizonte, MG, ocorrido em março de 1993, foi provocado por *Staphylococcus aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", que produzia 180ng de "SEH"/mL, em fluido sobrenadante de cultura. Exemplifica ainda este surto, quiza pioneiramente, o primeiro relato científico de intoxicação estafilocócica provocada por enterotoxina H ("SEH").

6 - CONCLUSÕES

De acordo com o delineamento analítico adotado neste experimento e com base nos resultados apresentados e discutidos anteriormente, faz-se cabível concluir o que se explana.

6.1. Quanto a produção e quantificação de enterotoxinas, em meios de cultivo laboratorial

I - A adição de 5% (v/v) de IgG normal e purificada de coelho aos fluidos sobrenadantes de culturas das linhagens teste e de *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED" mostrou-se eficaz na eliminação de reações inespecíficas, no ensaio de "RPLA".

II - O método "membrana sobre ágar" apresentou-se como o melhor procedimento de produção de "SE", com ênfase para as linhagens produtoras de "SEA" (*S.cohnii* e *S.epidermidis*, ref. 366 e 10) e "SEC" (*S.chromogenes*, *S.haemolyticus*, *S.haemolyticus*, *S.hyicus*, *S.xylosus* e *S.xylosus*, ref. 146, 107, 214, 129, 141 e 335).

III - Os meios de cultivo laboratorial "Nz4", "BHI"-2x-0,5 e "Nz6" sobressaíram por melhor desempenho na aquisição de resultados positivos; "Nz4" destacando-se no método "saco de diálise" preparado com 20mL de solução tampão, "BHI-2x-0,5" no método "saco de diálise" preparado com 10mL de solução tampão e "Nz4" e "Nz6" apresentaram idêntico desempenho no método "membrana sobre ágar".

6.2. Quanto ao comportamento e produção de enterotoxinas, em alimentos

i - Com exceção de *S.sciuri*, ref. 308, que não se desenvolveu apenas em leite integral tipo "longa vida" e o fazendo em presunto cozido, todas linhagens teste e *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", apresentaram desenvolvimento nestes alimentos quando incubados a 30°C, nos períodos de 24 e 48h.

ii - Não se observou para nenhuma das linhagens teste, produção de "SE", a partir de leite integral tipo "longa vida" testado através do ensaio de "ELISA, SET-EIA", e presunto cozido testado através do ensaio de "ELISA, SET-EIA" e "RPLA".

6.3. Quanto à elucidação do surto

i - *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED", estava presente em queijo tipo "Minas" envolvido no surto, em concentração equivalente a $2,9 \times 10^8$ UFC/g, e seu desenvolvimento atípico em ágar "BP", manifestado por colônias desprovidas de halo de lecitinase e lipase, poderia tê-lo feito não perceptível aos olhos desavisados do pesquisador.

ii - A linhagem utilizada no preparo de reagentes para o ensaio de "ELISA, SET-EIA", *S.aureus* 1151M, confirmou-se produtora de "SED" e "SEH".

iii - Ao contrário do ensaio de "ELISA, SET-EIA", os ensaios de "RPLA" e "ELISA-RIDASCREEN" apresentaram elevado grau de especificidade não apresentando reação cruzada para "SED" e "SEH".

iv - O surto de intoxicação alimentar envolvendo queijo tipo "Minas", em Belo Horizonte, MG, em março de 1993, foi ocasionado por *S.aureus* sub-espécie *aureus*, ref. "FUNED" que produzia 180ng de "SEH"/mL de fluido sobrenadante de cultura.

7 - PERSPECTIVA DE NOVAS PESQUISAS

Considerando a ausência de trabalhos que buscam o estudo taxonômico e de comportamento e produção de enterotoxinas por estafilococos coagulase negativos. Levando-se em conta, principalmente, os resultados negativos obtidos nesta pesquisa no que tange à produção de "SE" pelas 14 linhagens teste, quando experimentalmente inoculadas em leite integral tipo "longa vida" e presunto cozido, fizeram-se não elucidadas algumas questões que podem abrir, possivelmente, perspectivas a novas pesquisas, conforme abaixo se aborda:

- i - De forma a se confirmar ou não a ausência ou presença de produção de "SE", outros alimentos, como por exemplo, creme de confeitaria e creme de malonesse, poderiam ser utilizados como substrato, para avaliação mais acurada das 14 linhagens teste. Por sua vez, a adoção de temperatura de incubação elevada para 35-37°C poderia funcionar como fator favorável, sem se desconsiderar que tais temperaturas representam condição ainda compatível com a climática nacional.
- ii - Maior atenção deve ser dedicada ao ensaio de "RPLA" no que concerne ao comportamento das linhagens teste *S.chromogenes*, *S.hyicus* e *S.xylosus*, ref. 146, 129 e 335, que, havendo neste produzido "SEC", em concentrações expressivas, em condições de cultivo laboratorial, não puderam ter produção de "SE" confirmada por "OSP" e nem a produziram em alimentos.
- iii - A busca de "software" voltado à exploração do perfil de espécies coagulase negativas, far-se-á útil para melhor aproveitamento do estudo classificatório conduzido neste experimento para as 14 linhagens teste.

8 - ANEXOS

8.1 - Anexo 1

Ágar Azul de O-toluidina-DNA, formulação segundo ABNT, MB-3464, 1991.

Ácido desoxiribonucleico.....	0,03g
Cloreto de cálcio anidro p.a. (CaCl ₂).....	0,0011g
Cloreto de sódio p.a (NaCl).....	10g
Azul de O-toluidina (solução aquosa a 1%) C ₇ H ₉ N.....	8,3g
Tris (hidroximetil) aminometano (C ₄ H ₁₁ NO ₃).....	6,1g
Ágar.....	10g
Água destilada.....	1000mL

Dissolver o tris (hidroximetil) aminometano em 1000mL de água destilada e ajustar a pH 9,0. Adicionar os demais ingredientes, exceto o azul de O-toluidina, aquecendo até a ebulição para completa dissolução. Adicionar o azul de O-toluidina, distribuir em frascos com tampa de borracha e conservar em geladeira a 4°C. A esterilização é desnecessária.

8.1 - Anexo 2

Ágar P, formulação segundo KLOOS *et al* (1974)

Peptona (Difco).....	10g
Extrato de levedura (Difco).....	5g
Cloreto de sódio (NaCl).....	5g
Glicose.....	1g
Ágar-ágar (Difco).....	15g
Água destilada.....	1000mL

Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS⁵

- ABBAR, F.M.; MOHAMMED, M.T.; ARSLAIN, S.H. Selected biological properties of enterotoxigenic staphylococci isolated from milk. *J. Food Protect.*, v.49, n.11, p.871-873, 1986.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). *Alimentos - Contagem de S.aureus em placas*. MB-3464, 1991, p.1-4.
- ADEKEYE, J. D. Enterotoxin production by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from animals and man in Nigeria. *Vet. Microbiol.*, v.5, p.143-150, 1980.
- ADEKEYE, J.D. & ADESIYUN, A.A. Frequency of isolation of enterotoxigenic staphylococci from milk or nursing mothers in Kaduna, Nigeria. *J. Hyg. Camb.*, v.93, p.531-538, 1984.
- ADESIYUN, A.A.; ESCHBACH, M.; LENZ, W. *et al.* Detection of enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains: a comparative use of the modified Ouchterlony precipitation test, reversed passive latex agglutination test, and avidin-biotin ELISA. *Can. J. Microbiol.*, v.38, n.11, p. 1097-1101, 1992.
- ADESIYUN, A.A.; LENZ, W.; SCHAAL, K.P. Phage susceptibility and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from nigerian foods. *J. Food Protect.*, v.55, n.11, p.871-887, 1992.
- ADESIYUN, A.A.; TATINI, S.R.; HOOVER, D.G. Production of enterotoxin(s) by *Staphylococcus hyicus*. *Vet. Microbiol.*, v.9, p.487-495, 1984.
- ADESIYUN, A.A. & USMAN, B. Isolation of enterotoxigenic strains of staphylococci from dogs. *Vet. Microbiol.*, v.8, p.459-468, 1983.
- AHMED, A.H.A.; MOUSTAFA, K.M.; MARTH, E.H. Growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in whey from the manufacture of Domiati cheese. *J. Food Protect.*, v.46, n.3, p.235-237, 1983.
- ALKANAHL, H.A. & GASIM, Z. Foodborne disease incidents in the eastern province of Saudi Arabia - A five-year summary, 1982-1986. *J. Food Protect.*, v.55, n.1, p.84-87, 1993.
- ALLEN, V.D. & STOVALL, W.D. Laboratory aspects of staphylococcal food poisoning from Colby cheese. *J. Milk Food Technol.*, v.23, p.271-274, 1960.

⁵ Referências normalizadas de acordo com ABNT, NB-T66, maio, 1989.

- ALMEIDA, J.A. G.; NOVAK, F.R.; ALMEIDA, C.H.G. A ocorrência de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em leite humano ordenhado. In: *Encontro Regional Sudeste de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 1, Juiz de Fora, 1993, 59p.
- ANDERSON, P.H.R. & STONE, D.M. Staphylococcal food poisoning associated with spray-dried milk. *J. Hyg.*, v.53, p.387-397, 1955.
- ANGELOTTI, R. Staphylococcal intoxications. In: RIEMAN, H. (ed.) *Food-borne infections and intoxications*. New York, Academic Press, 1969. p.359-399.
- ANUNCIAÇÃO, L.L.C. *Estudo da produção de enterotoxina estafilocócica tipo "A" em queijos tipo Minas e bolos recheados*. (Tese de Mestrado - Instituto de Ciências Biológicas - UFMG - MG). 1992. 119p.
- APHA. American Public Health Association. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. SPECK, M.L (ed.), 2ª ed., Washington, D.C., 1984.
- ARAUJO, M.A.; UTHIDA-TANAKA, A.M.; CASTRO, O.C. *Staphylococcus aureus*. II. Prevalência em portadores sãos com conjuntivite estafilocócica. *Rev. Microbiol.*, v.16, n.1, p.41-45, 1985.
- ARAUJO, W.C. *Staphylococcus aureus em leite cru: produção de enterotoxina, caracterização da origem provável humana ou bovina a partir das cepas isoladas*. (Tese de Mestrado - Universidade de São Paulo - SP). 1984. 120p. Apud: FREITAS, M.A.Q. & MAGALHAES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus*, isolados de vacas com mastite. *Rev. Microbiol.*, v.21, n.4, p.315-319, 1990.
- ARAUJO, W.P. & ZEBRAL, A.A. Estudos sobre *Staphylococcus*. II - Comportamento de um grupo de profissionais alunos como portadores de estafilococo coagulase-positivo. *An. Fac. Nac. Odont.*, v.14, p.62-81, 1961.
- ARBUTHNOTT, J.P.; COLEMAN, D.C.; AZAVEDO, J.S. *et al.* Staphylococcal toxins in human disease. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement.*, p.101-107, 1990.
- ARMJO, R.; HENDERSON, D.A.; TIMOTHEE, R. *et al.* Food poisoning outbreaks associated with spray-dried milk - an epidemiologic study. *Am. J. Public Health.*, v.47, p. 1093-1100, 1957.
- AUTIO, K.L; ROSEN, S.; REYNOLDS, N.J. *et al.* Studies on cross-contamination in the dental clinic. *J. Am. Dental Assoc.*, v.100, p.358-361, 1980.
- AVENA, R.M. & BERGDOLL, M.S. Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361. *Biochemistry*, v.6, p.1474-1480, 1967.

- AYULO, A.M.R.; MACHADO, R.A.; SCUSSEL, V.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *Int. J. Food Microbiol.*, v.24, p.171-178, 1994.
- BAER, E.F. Proposed method for isolating coagulase-positive staphylococci from food products: report of a collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v.49, p.270-273, 1966.
- BARBER, L.E. & DEIBEL, R.H. Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage. *Appl. Microbiol.*, v.24, n.6, p.891-898, 1972.
- BARBER, M.A. Milk poisoning due to a type of *Staphylococcus albus* occurring in the udder of a healthy cow. *Philippine J. Sci. Section B (Tropical Medicine)*, v.9, p.515-519, 1914.
- BAIRD-PARKER, A.C. Staphylococci and their classification. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.128, p.65-68, 1965. Apud: SMITH, H.B.H. & FARKAS-HIMSLEY, H. The relationship of pathogenic coagulase-negative Staphylococci to *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Microbiol.*, v.15, p.879-890, 1969.
- BAIRD-PARKER, A.C. Factors affecting the production of bacterial food poisoning toxins. *J. Appl. Bacteriol.*, v.34, n.1, p.181-197, 1971.
- BAIRD-PARKER, A.C. The staphylococci - an introduction. *J. Appl. Bacteriol. Suppl.*, 1S-8S, 1990.
- BAIRD-PARKER, A.C. Foods and microbiological risks. *Microbiology*, v.140, p.687-695, 1994.
- BANKES, P. & SALLY, A.R. Rapid detection of staphylococcal enterotoxins in foods with a modification of the reversed passive latex agglutination assay. *J. Appl. Bacteriol.*, v.67, p.395-399, 1989.
- BANNERMAN, T.L. & KLOOS, W.E. *Staphylococcus capitis* subsp. ureolyticus subsp. nov., an inhabitant of human and nonhuman skin. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1990.
- BAUTISTA, L.; BERMEJO, M.P.; NUÑEZ, M. Seasonal variation and characterization of *Micrococcaceae* present in ewes' raw milk. *J. Dairy Res.*, v.53, p.1-5, 1986.
- BAUTISTA, L.; GAYA, P.; MEDINA, M. *et al.* A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.54, n.2, p.566-569, 1988.
- BAYLES, K.W. & IANDOLO, J.J. Genetic and molecular analysis of the encoding staphylococcal enterotoxin D. *J. Bacteriol.*, v.171, p.4799-4806, 1989.
- BEERY, J.T.; TAYLOR, S.L.; SCHLUNZ, L.R. *et al.* Effects of staphylococcal enterotoxin A on the rat gastrointestinal tract. *Infect. Immun.*, v.44, n.2, p.234-240, 1984.

- BENCHETRIT, L.C.; BORGES-NETO, A.A.; OBADIA, I. *et al.* Impetigo in Rio de Janeiro: Streptococcal and staphylococcal isolates from skin lesions, nose and throat in children. *Rev. Microbiol.*, v.13, n.4, p.347-354, 1982.
- BENNETT, R.W. & McCLURE, F. Collaborative study of the serological identification of staphylococcal enterotoxins by the microslide gel double diffusion test. *J. Assoc. Anal. Chem.*, v.59, n.3, p.594-601, 1976
- BENNETT, R.W. & McCLURE, F. Visual screening with enzyme immunoassay for staphylococcal enterotoxins in foods: collaborative study. *Food Biological Contaminants*, v.77, n.2, p.357-364, 1994.
- BENNETT, R.W.; YETERIAN, M.; SMITH, W. *et al.* *Staphylococcus aureus* identification, characteristics and enterotoxigenicity. *J. Food Sci.*, v.51, n.5, p.1337-1339, 1986.
- BERDAL, B.P.; OLSVIK, Ø.; OMLAND, T. A sandwich ELISA method for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Acta path. microbiol. scand. Sect. B.*, v.89, p.411-415, 1981.
- BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning. In: RIEMAN, H. & BRYAN, F.L. (ed). *Foodborne infections and intoxications*. New York, Academic Press, 1979. p.284.
- BERGDOLL, M.S. Enterotoxins. In: EASMAN, C.F.S. & ADIAM, C. (ed.). *Staphylococci and staphylococcal infections*. London. Academic Press, 1983. Apud: PEREIRA, J.L. *Estudo do comportamento de linhagens de S.aureus baixo produtoras de enterotoxina tipo D em meio de hidrolisado proteico, creme de confeitaria e presunto cozido.* (Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP - SP). 1990. 123p.
- BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M.P. (ed). *Foodborne bacterial pathogens*. INC, New York, 1989. p.463-523.
- BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning. In: CLIVER, D.O. (ed). *Foodborne diseases*. San Diego, CA, Academic Press, 1990a. Cap. 5, p.86-106.
- BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.*, v.10, p.91-100, 1990b.
- BERGDOLL, M.S. Importance of staphylococci that produce nanogram quantities of enterotoxin. *Zbl. Bakt.*, v.282, p.1-6, 1995.
- BERGDOLL, M.S; BORJA, C.R.; AVENA, R.M. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. *J. Bacteriol.*, v.90, p.1481-1485, 1965.

- BERGDOLL, M.S.; BORJA, C.R.; ROBBINS, R.N. *et al.* Identification of enterotoxin E. *Infect. Immunity*, v.4, n.5, p.593-595, 1971.
- BERGDOLL, M.S. & REISER, R. Application of radioimmunoassay for detection of staphylococcal enterotoxin in foods. *J. Food Protect.*, v.43, n.1, p.68-72, 1980.
- BERGDOLL, M.S. & ROBBINS, R.N. Characterization of types of staphylococcal enterotoxins. *J. Milk Food Technol.*, v.36, p.610-612, 1973.
- BERGDOLL, M.S.; SURGALLA, M.J.; DACK, G.M. Staphylococcal enterotoxin. Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property. *J. Immunol.*, v.83, p.334-338, 1959.
- BERGDOLL, M.S.; WEISS, K.F.; MUSTER, M.J. The production of staphylococcal enterotoxin by a coagulase-negative microorganism. In: *Bacterial Proceedings, American Society for Microbiology*, 1967. p.12
- BETLEY, M.J. & BERGDOLL, M.S. Staphylococcal enterotoxin type C genes not associated with extrachromosomal DNA. *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 1981, p.49.
- BETLEY, M.J.; BORST, D.W.; REGASSA, L.B. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. *Chem. Immunol.*, v.55, p.1-35, 1992.
- BETLEY, M.J.; LÖFDAHL, S.; KRIESWIRTH, B.N. *et al.* Staphylococcal enterotoxin A gene is associated with a variable genetic element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.81, p.5179-5183, 1984.
- BETLEY, M.J. & MEKALANOS, J.J. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science*, v.229, p.185-187, 1985.
- BHATTI, A.R.; SIDIQI, Y.M.; MICUSAN, V.V. Highly sensitive fluorogenic enzyme-linked immunosorbent assay: detection of staphylococcal enterotoxin B1. *J. Microbiol. Methods*, v.19, p.179-187, 1994.
- BLAIR, J.E. What is a *Staphylococcus*? *J. Bacteriol.*, v.26, p.375-381, 1962.
- BLAIR, J.E. & WILLIAMS, M.D. Phage typing of Staphylococci. *Bull. Org. mond. Santé*, v.24, p.771-784, 1961.
- BLOBEL, H. & BERMAN, D.T. Further studies on the vivo activity of staphylocoagulase. *J. Infect. Disease*, v.108, p.63-67, 1961.

- BODEN, M.K. & FLOCK, J.I. Fibrinogen-binding protein/clumping factor from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, v.57, p.2358-2363, 1989.
- BORJA, C.R. & BERGDOLL, M.S. Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by *Staphylococcus aureus* strain 137. *Biochemistry*, v.6, p.1467-1473, 1967.
- BORJA, C.R.; FANNING, E.; HUANG, I.H. *et al.* Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin E. *J. Biological Chem.*, v.247, n.8, p.2456-2463, 1972.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. *Portaria nº 01, de 28 de janeiro de 1987*. Seção 1. Brasília, DF, 1987. p. 2197-2200.
- BRECKINRIDGE, J.C. & BERGDOLL, M.S. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin producing *Staphylococcus*. *Medical Intelligence*, v.284, n.10, p.541-543, 1971.
- BROWDER, H.P.; ZYGMUNT, W.A.; YOUNG, J.R. *et al.* Lysostaphin: enzymatic mode of action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.19, p.383-389, 1965. Apud: GUTIERREZ, L.M.; MENES, I., GARCIA, M.L. *et al.* Sensitivity to lysostaphin as a criterion for the identification of *Staphylococci* from animal origin. *J. Appl. Bacteriol.*, v.50, p.541-549, 1981.
- BRYAN, F.L. Factors that contribute to outbreaks of foodborne disease. *J. Food Protect.*, v.41, p.816-827, 1978.
- BRYAN, F.L. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. *J. Food Protect.*, v.43, p.140-150, 1980.
- BRYAN, F.L. Risks associated with vehicles of foodborne pathogens and toxins. *J. Food Protect.*, v.51, p.498-508, 1988.
- BUXER, S.; BONVENTRE, P.F.; ARCHER, D.L. Specific receptor binding staphylococcal enterotoxins by murine splenic lymphocytes. *Infect. Immun.*, v.33, n.3, p.827-833, 1981.
- CAFARCHIA, C.; CELANO, G.; FATIZZO, F. *et al.* Enterotossigenicità di ceppi di *Staph. aureus* isolati da alimenti mediante biosaggio su *Artemia salina*. *Industrie Alimentari*, v.32, p.1198-1199, 1993.
- CARMO, L.S. & BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brasil). *Rev. Microbiol.*, v.21, n.4, p.320-323, 1990.
- CASMAN, E.P. Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. *J. Bacteriol.*, v.7, p.849-856, 1960.

- CASMAN, E.P.; BENNET, A.E.; ISSA, J.A. *et al.* Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *J. Bacteriol.*, v.94, p.1875-1882, 1967.
- CASMAN, E.P.; BENNET, A.E.; DORSEY, A.E. The microslide gel double gel diffusion test for the detection and assay of staphylococcal enterotoxins. *Health Lab. Sci.*, v.6, p.185-198, 1969.
- CASMAN, E.P.; BERGDOLL, M.S.; ROBINSON, J. Designations of staphylococcal enterotoxins. *J. Bacteriol.*, v.85, p.715-716, 1963.
- CASMAN, E.P.; McCOY, D.W.; BRANDLY, P.J. Staphylococcal growth and enterotoxin production in meat. *Appl. Microbiol.*, v.2, p.849-500, 1963b.
- CARDOSO, C.L.; TEIXEIRA, L.M.; GONTIJO FILHO, P.P. Antimicrobial susceptibilities and phage typing of hospital and non-hospital strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Rev. Microbiol.*, v.19, n.4, p.385-392, 1988.
- CARVALHO, E. P. *Determinação da microbiota do polvilho azedo*. (Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas - SP). 1994.170p.
- CAUDIL, F.W. & MEYER, M.A. An epidemic of food poisoning due to pasteurized milk. *J. Milk Food Technol.*, v.6, p.73-76, 1943.
- CDC.Center for Disease Control. Presumed staphylococcal food poisoning associated with whipped butter. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*, v.26, p.268, 1977.
- CDC.Center for Disease Control. Interstate common - source outbreaks of staphylococcal food poisoning - North Carolina, Pennsylvania. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*, v.32, p.183-184, 1983a.
- CDC.Center for Disease Control. Staphylococcal food poisoning on a cruise ship. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*, v.32, p.294-295, 1983b.
- CDC.Center for Disease Control. Staphylococcal food poisoning from turkey at a country club buffet - New Mexico. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*, v.32, p.715-716, 721-722, 1986.
- CZOP, J.K. & BERGDOLL, M.S. Staphylococcal enterotoxin synthesis during the exponential, transitional, and stationary growth phases. *Infect. Immun.*, v.9, n.2, p.229-235, 1974.
- CHANG, H.-C. & BERGDOLL, M.S. Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin D. *Biochemistry*, v.18, p.1937-1942, 1979.

- CHAPMAN, G.H. LIEB, C.W.; CURCIO, L.G. Isolation and cultural differentiation of food-poisoning staphylococci. *Food Research*, v.2, p.349-367, 1937.
- CHU, F.S.; THADHANI, K.; SCHANTZ, E.J. *et al.* Purification and characterization of staphylococcal enterotoxin A. *Biochemistry*, v.5, p.3281-3289, 1966.
- CLIVER, D.O. Foodborne diseases in the United States, 1946-1986. *Int. J. Food Microbiol.*, v.4, p.269-277, 1987.
- COLLINS, W.S.; METZGER, J.F.; JOHNSON, A.D. A rapid solid phase radioimmunoassay for staphylococcal B enterotoxin. *J. Immunol.*, v.108, p.852-856, 1972.
- COSTA, E.O.; BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A. *et al.* Estudo etiológico da mastite clínica bovina. *R. bras. Med. Vet.* v.17, n.4, p.156-158, 1995.
- CRASS, B.A. & BERGDOLL, M.S. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, v.23, p.43-45, 1986.
- CROWLE, A.J. A simplified microdouble-diffusion agar precipitin technique. *J. Lab. Clin. Med.*, v.52, p.784-787, 1958.
- CRUICKSHANK, J.G. Food handlers and food poisoning. Training programmes are the best. *Brit. Med. J.*, v.300, n.6719, p.207-208, 1990.
- DACK, G.M.; CARY, W.E.; WOOLPERT, O. *et al.* An outbreak of food poisoning proved to be due a yellow haemolytic *Staphylococcus*. *J. Preventive Med.*, v.4, p.167-175, 1930. Apud: BAIRD-PARKER, A.C. The staphylococci - an introduction. *J. Appl. Bacteriol. Suppl.*, 15-8S, 1990.
- DACK, G. M. *Food Poisoning*. University Press, 2ed., Chicago, 1949. Apud: BAIRD-PARKER, A.C. The staphylococci - an introduction. *J. Appl. Bacteriol. Suppl.*, 15-8S, 1990.
- DACK, G.M. *Staphylococcus* enterotoxin: a review. *Jap. J. M. Sc. & Biol.*, v.16, p.1-12, 1963.
- DAMETTO, V.F. & ZELANTE, F. Observações sobre portadores de *Staphylococcus aureus* entre estudantes de odontologia. *Rev. Fac. Odont. S. Paulo*, v.19, n.2, p.195-204, 1981.
- DANIELSON, M.L. & HELBERG, B. The biochemical activity of enterotoxin and non-enterotoxin producing *Staphylococci*. *Acta vet. scand.*, v.18, p.266-273, 1977.
- DANIELSON, M.L. & HELBERG, B. Prevalence of enterotoxigenic staphylococci in nose, throat and skin lesions in meat-workers. *Acta vet. scand.*, v.25, p.242-249, 1984.

- DARINI, A. M. C.; PASSOS Jr., G.A.S.; LEVY, C.E.; *et al.* Study of multiresistant *Staphylococcus aureus* isolates from a brazilian hospital. *Rev. Microbiol.*, v.25, n.4, p.225-228, 1994.
- DAVEY, G.R. Food poisoning in New South Wales: 1977-84. *Food Technol. Australia*, v.37, n.10, p.453-456, 1985.
- DAVISON, E.; DACK, G.M.; CARY, W.E. Attempts to assay the enterotoxic substance produced by *Staphylococci* by parenteral injection of monkeys and kittens. *J. Infect. Dis.*, v.6, p.219-223, 1933.
- De BUYSER, M.L.; DILASSER, F.; HUMMEL, R. *et al.* Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production by staphylococci isolated from goat's milk. *Int. J. Food Microbiol.*, v.5, p.301-309, 1987.
- de la FUENTE, R.; SUAREZ, G.; SCHLEIFER, K.H. *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* subsp. nov. - The causal agent of abscess disease of sheep. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.35, p.99-102, 1985.
- de la FUENTE, R.; ALMAZAN, J.; VALLE, J. *et al.* Enterotoxicity of *S.aureus* and *S.intermedius* strains isolated from dogs. In: *Proceedings, 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications*. Berlin (West). v.1, p.362-364, 1986.
- DELAZARI, I. & LEITÃO, M.F.F. *Staphylococcus aureus* enteropatogênico em macarrão. *Ciênc. Tecnol. Alim.*, v.7, p.485-497, 1976.
- DELAZARI, I.; LEITÃO, M.F.F.; GERALDINI, A.M. *et al.* Desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxina em queijo tipo Minas. *Ciênc. Tecnol. Alim.*, v.9, p.163-174, 1978.
- DENNY, C.B.; TAN, P.L.; BOHRER, C.W. Heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A. *J. Food Sci.* v.31, p.762-767, 1966.
- DEVRIESE, L.A. Isolation and identification of *Staphylococcus hyicus*. *Am. J. Vet. Res.*, v.38, n.6, p.787-797, 1977.
- DEVRIESE, L.A. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal sources. *J. Appl. Bacteriol.*, v.56, p.215-220, 1984.
- DEVRIESE, L.A. & DERYCKE, J. *Staphylococcus hyicus* in cattle. *Res. Vet. Science.*, v.26, p.356-358, 1979.
- DEVRIESE, L.A. & HÁJEK, V. Identification of pathogenic staphylococci isolated from animals and foods derived from animals. *J. Appl. Bacteriol.*, v.49, p.1-11, 1980.

- DEVRIESE, L.A.; HÁKEK, V.; OEDING, S.A. *et al.* *Staphylococcus hycus* (Sompolinsky 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hycus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.28, n.4, p.482-490, 1978.
- DEVRIESE, L.A. & OEDING, P. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *Res. Vet. Science*, v.21, p.284-291, 1976.
- DEVRIESE, L.A.; POUTREL, B.; KILPPER-BÄZ *et al.* *Staphylococcus gallinarum* and *Staphylococcus caprae*, two new species from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.33, p.480-486, 1983.
- DEVRIESE, L.A.; SCHLEIFER, K.H.; ADEGOKE, G.O. Identification of coagulase negative staphylococci from farm animals. *J. Appl. Bacteriol.*, v.55, p.45-55, 1985.
- DICKIE, N. & AKHTAR, M. Concentration of staphylococcal enterotoxin from food extract using copper chelate sepharose. *J. Food Protect.*, v.52, n.12, p.903-905, 1989.
- DOHLSTEN, M.; HEDLUND, G.; KALLAND, T. Staphylococcal-enterotoxin-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Immunology Today*, v.12, n.5, p.147-150, 1990.
- DOLMAN, C.E. & WILSON, R.J. The kitten test for *Staphylococcus* enterotoxin. *Can. Publ. Health J.*, v.31, p.68-71, 1940.
- DONNELLY, C.B.; LESLIE, J.E.; BLACK, A.A. *et al.* Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese. *Appl. Microbiol.*, v.15, n.6, p.1382-1387, 1967.
- DONNELLY, C.B.; LESLIE, J.E.; BLACK, A.A. Production of enterotoxin A in milk. *Appl. Microbiol.*, v.16, p.917-924, 1968.
- DYER, D.W. & IANDOLO, J.J. Plasmid-chromosomal transition of genes important in staphylococcal enterotoxin B expression. *Infect. Immun.*, v.33, n.2, p.450-458, 1981.
- ESSERS, L. & RADEBOLD, K. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* by a latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol.*, v.12, p. 641-643, 1980.
- EVANS, J.B.; BUETTNER, L.G.; NIVEN, C.F. Jr. Evaluation of the coagulase test in the study of staphylococci associated with food poisoning. *J. Bacteriol.*, v.60, p.481-484, 1950.
- EVANS, J.B. & NIVEN, C.F.Jr. A comparative study of know food-poisoning staphylococcal and related varieties. *J. Bacteriol.*, v.59, p.545-550, 1950.
- EVENSON, M.L. HINDS, M.W. BERNSTEIN, R.S. *et al.* Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.*, v.7, p.311-316, 1988.

- EY, P.L.; PROWSE, S.J.; JENKEN, C.R. Isolation of pure IgG1, IgG2a, and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Biochem.* v.15, p.429-436, 1978.
- EWALD, S. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of staphylococcal enterotoxin in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, v.6, p.141-153, 1988.
- FDA. Food Drug and Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. Arlington, Association of Official Analytical Chemists. 7th ed., Arlington, VA, 1992.
- FERREIRO, L. Agentes etiológicos e terapêuticos da mastite bovina no Brasil. *Arq. Fac. Vet. UFRGS.*, v.6, p.77-88, 1978.
- FERREIRO, L.; SANTOS, E.C.; SILVA, N. Ocorrência e etiologia da mastite na "Zona da Mata" do Estado de Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. UFMG.*, v.33, n.1, p.31-37, 1981.
- FEY, H. & PFISTER, H. A diagnostic kit for the detection of staphylococcal enterotoxins (SET) A, B, C and D (SEA, SEB, SEC, SED). In: AVRAMEAS, S. et al. (eds.). *Immunoenzymatic Techniques*. Elsevier, Amsterdam, 1983. p.345-348.
- FEY, H.; PFISTER, H.; RÜEGG, O. Comparative evaluation of different enzyme-linked immunosorbent assay systems for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, and D. *J. Clin. Microbiol.*, v.19, n.1, p.34-38, 1984.
- FOSTER, T.J. & McDEVITT, D. Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: Their possible roles in virulence. *FEMS Microbiol. Letters.*, v.118, p.199-206, 1994.
- FREED, R.C.; EVENSON, M.L.; REISER, R.F. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.44, n.6, p.1349-1355, 1982.
- FREITAS, M.A.Q. & MAGALHAES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus*, isolados de vacas com mastite. *Rev. Microbiol.*, v.21, n.4, p.315-319, 1990.
- FRENEY, J.; BRUN, Y.; BES, M. et al. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov., and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.38, p.168-172, 1988.
- FUJIKAWA, H. & IGARASHI, H. Rapid latex agglutination test for detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.54, n.10, p.2345-2348, 1988.
- FUKUDA, S.; TOKUNA, H.; OGAWA, H. et al. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* strains isolated from dogs. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. A.*, v.258, p.360-367, 1984.

- FUNG, D.Y.C. & WAGNER, J. Capillary tube assay for staphylococcal enterotoxin A, B and C. *Appl. Microbiol.*, v.21, n.3, p.559-561, 1971.
- FURLANNETO, S.M.P.; NADER FILHO, A.; WILSON, D. *et al.* *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados a partir de leite de vacas mastíticas. *Rev. Microbiol.*, v.18, n.2, p.138-143, 1987.
- GALLO, C. *Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica.* (Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas - SP). 1990. 388p.
Apud: CARVALHO, E. P. *Determinação da microbiota do polvilho azedo.* (Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas - SP). 1994. 170p.
- GARCÍA, M.L.; FRANCISCO, J.J.; MORENO, B. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* species by food handlers. *Int. J. Food Microbiol.*, v.3, n.2, p.99-108, 1986.
- GARCIA, M.L.; MORENO, B.; BERGDOLL, M.S. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.39, n.3, p.548-553, 1980.
- GAYA, P.; MEDINA, M.; BAUTISTA, L. *et al.* Survival of *Staphylococcus aureus* in raw sheep milk Manchego cheeses ripened at different temperatures. *J. Appl. Bacteriol.*, v.57, n.17, p. 1984.
- GEIGER, J.C.; CROWLWY, A.B.; GRAY, J.P. Food poisoning from ice cream on ships. *J. Amer. Med. Assoc.*, v.105, p.1980-1981, 1935.
- GELLI, D.S.; TANAKA, A.Y.; ROCHA, M.M.M. *et al.* Intoxicação alimentar por enterotoxina estafilocócica no estado de São Paulo. *Rev. Microbiol.*, v.20, n.51, p.57, 1989 (Resumo).
- GENIGEORGIS, C.A.; RIEMAN, H.; SADLER, W.W. Production of enterotoxin-B in cured meats. *J. Food Sci.*, v.34, p.62-68, 1969.
- GENIGEORGIS, C.A. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int. J. Food Microbiol.*, v.9, n.4, p.327-360, 1989.
- GIBBS, P.A.; PATTERSON, J.T.; HARVEY, J. Biochemical characteristics and enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from poultry. *J. Appl. Bacteriol.*, v.44, p.57-74, 1978.
- GOERING, R. & BAUERNFEIND, A. *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis: an epidemiological analysis using a combination of traditional and molecular methods. *Infection*, 1990.
- GOMEZ-LÚCIA, E.; GOYACHE, J.; ORDEN, J.A. *et al.* Production of enterotoxin A by supposedly nonenterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.55, p.1447-1451, 1989.

- GOYACHE, J.; ORDEN, J.A.; BLANCO, J. L. *et al.* Determination of the reactivities and cross-reactivities of monoclonal antibodies against staphylococcal enterotoxin A by indirect ELISA and immunoblot including a semiautomated electrophoresis system. *Letters Appl. Microbiol.*, v.14, p.217-220, 1992.
- GROSSGEBAUER, K.; SCHIMIDT, B.; LANGMAACK, H. Lysozyme production as an aid for identification of potentially pathogenic strains of staphylococci. *Appl. Microbiol.*, v.16, p.1745-1747, 1968.
- GUTIERREZ, L.M.; MENES, I.; GARCIA, M.L. *et al.* Sensitivity to lysostaphin as a criterion for the identification of staphylococci from animal origin. *J. Appl. Bacteriol.*, v.50, p.541-549, 1981.
- GUTIERREZ, L.M.; MENES, I.; GARCIA, M.L. *et al.* Characterization and enterotoxigenicity of staphylococci isolated from mastitic ovine milk in Spain. *J. Food Protect.*, v.45, n.14, p.1282-1296, 1982.
- HACKER, J.F. Outbreak of *Staphylococcus* milk poisoning in pasteurized milk. *Am. J. Public Health.*, v.29, p.1247-1249, 1939.
- HAHN, I.F.; PICKENHAHN, P.; LENZ, W. *et al.* An avidin-biotin ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxins A and B. *J. Immunol. Methods.*, v.92, p.25-29, 1986.
- HÁJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.26, n.4, p.401-408, 1976.
- HÁJEK, V. Identification of enterotoxigenic staphylococci from sheep and sheep cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.35, n.2, p.264-268, 1978.
- HÁJEK, V.; DEVRIESE, L.A.; MORDARSKI, M. *et al.* Elevation of *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* (Devriese *et al.* 1978) to species status: *Staphylococcus chromogenes* (Devriese *et al.* 1978) comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.8, p.169-173, 1986.
- HÁJEK, V. & MARSALEK, E. The occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains in hosts of different animal species. *Zentralbl. Bakteriол. Orig. A.*, v.223, p.63-68, 1973.
- HALLANDER, H.O. Production of large quantities of enterotoxin B and other staphylococcal toxins on solid media. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, v.63, p.299-305, 1965.
- HALPIN-DOHNALEK, M.I. & MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods - a review. *J. Food Protect.*, v.52, n.4, p.267-282, 1989.

- HAMMON, W.M. *Staphylococcus enterotoxin: improved cat test, chemical and immunological studies. Am. J. Publ. Health.*, v.31, p.1191-1198, 1941.
- HARBRECHT, D.F. & BERGDOLL, M.S. Staphylococcal enterotoxin B production in hard-boiled eggs. *J. Food Sci.*, v.45, p.307-309, 1980.
- HARROP, M.H.V.; PEREIRA, L.J.G.; BRITO, J.R.F. *et al.* Incidência de mastite bovina na bacia leiteira da Zona do Agreste Meridional de Pernambuco. *Pesq. Agropec. Ser. Vet.*, v.10, p.595-598, 1975.
- HARVEY, J. & GILMOUR, A. Application of current methods for isolation and identification of staphylococci in raw bovine milk. *J. Appl. Bacteriol.*, v.59, p.207-221, 1985.
- HARVEY, J. & GILMOUR, A. Isolation and characterization of staphylococci from goats milk produced in Northern Ireland. *Letf. Appl. Microbiol.*, v.7, p.79-82, 1988.
- HERRERO, F. *Estafilococos enterotoxigênicos em portadores assintomáticos: Isolamento e efeito de oxacilina na produção de proteínas extracelulares de interesse em alimentos.* (Tese de Mestrado - Universidade Estadual de Londrina - PR). 1992. 192p.
- HERRERO, F.; HIROOKA, E.Y.; FRESSATTI, R. *et al.* Presença de estafilococos enterotoxigênicos isolados de portadores sãos. *Rev. Microbiol.*, v.20, n.51, p.64, 1989a (Resumo).
- HERRERO, F.; HIROOKA, E.Y.; SILVA, N.S. Isolamento de *S.hyicus* enterotoxigênico em portadores humanos sãos. *Rev. Microbiol.*, v.20, n.51, p.63, 1989b (Resumo).
- HENDRICKS, S.L.; BELKNAP, R.A.; HAUSLER, W.J.Jr. Staphylococcal food intoxication due to cheddar cheese. I. Epidemiology. *J. Milk Food Technol.*, v.22, p.313-317, 1959.
- HIROOKA, E.Y. & MULLER, E.E. Isolamento, caracterização e enteropatogenicidade de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de produtos cárneos comercializados em Londrina, Paraná. *Cienc. Tecnol. Alim.*, v.2, 123-133, 1982.
- HIROOKA, E.Y.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C. *et al* Enterotogenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. *Int. J. Food Microbiol.*, v.7, p.185-191, 1988.
- HIROOKA, E.Y.; SALSBERG, S.P.C.; BERGDOLL, M.S. Production of staphylococcal enterotoxin A and thermonuclease in cream pies. *J. Food Protect.*, v.50, n.11, p.952-955, 1987.
- HOBBS, B.C. Food poisoning: observation on sources of *Salmonellae*, *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus*. *Ann. Inst. Pasteur Lille.*, v.15, p.31-41, 1964.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. *et al.* *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* Williams & Wilkins, Baltimore, 9th ed, 1994. 787p.

- HOOVER, D.G.; TATINI, S.R.; MALTAIS, J.B. Characterization of staphylococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.46, p.649-660, 1983.
- HUMBER, J.Y.; DENNY, C.B.; BOHRER, W. Influence of pH on the heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A as determined by monkey feeding and serological assay. *Appl. Microbiol.*, v.30, n.5, p.755-758, 1975.
- HUMPHREYS, H.; KEANE, C.T.; HONE, R. *et al.* Enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of septicaemia and from healthy carriers. *J. Med. Microbiol.*, v.28, p.163-172, 1989.
- HUNTER, A.C. Microflora and somatic cell content of goat milk. *Vet. Rec.*, v.114, p.318-320, 1984.
- HUSSEMAN, D.L. & TANNER, F.W. A comparison of strains of staphylococci isolated from foods. *Food Res.*, v.14, p.91-97, 1949.
- HUTZLER, R.U.; TRABULSI, L.R.; SILVA, G.R. Colonização de doentes hospitalizados por *Staphylococcus aureus* e bactérias gram-negativas. *Rev. Microbiol.*, v.3, n.4, p.179-189, 1972.
- IANDOLO, J.J. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.43, p.375-402, 1989.
- IANDOLO, J.J. & ORDAL, Z.J. Repair of thermal injury of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, v.91, p.134-142, 1966.
- IARIA, S.T. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico em doces cremosos vendidos em padarias e confeitarias do município de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde públ.*, v.15, p.321-327, 1981.
- IARIA, S.T.; FURLANETTO, S.M.P.; CAMPOS, M.L.C. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais, São Paulo, 1976. *Rev. Saúde públ.*, v.14, p.93-100, 1980.
- IBRAHIM, G.F. & BALDOCK, A.K. Thermostable deoxyribonuclease content and enterotoxigenicity of cheddar cheese made with sub-normal starter activity. *J. Food Protect.*, v.44, n.9, p. 655-660, 1981.
- ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microorganisms in foods. I. Their significance and methods of enumerations*. 3.ed. Toronto, University of Toronto Press, 1983, 431p.

- IGARASHI, H.; FUJIKAWA, H.; SHINGAKI, M. *et al.* Latex agglutination test for staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1. *J. Clin. Microbiol.*, v.23, n.2, p.509-512, 1986.
- IGIMI, S.; KAWAMURA, S.; TAKAHASHI, E. *et al.* *Staphylococcus felis*, a new species from clinical specimens from cats. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.39, n.4, p.373-377, 1989.
- IGIMI, S.; KAWAMURA, S.; TAKAHASHI, E. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.40, n.4, p.409-411, 1990.
- ISIGIDI, B.K.; MATHIEU, A.M.; DEVRIESE, L.A. *et al.* Enterotoxin production in different *Staphylococcus aureus* biotypes isolated from food and meat plants. *J. Appl. Bacteriol.*, v.72, p.16-20, 1992.
- JARVIS, A.W. & LAWRENCE, R.C. Production of high titers of enterotoxins for the routine testing of staphylococci. *Appl. Microbiol.*, v.19, p.698-699, 1970.
- JOHNSON, H.M.; BUKOVIC, P.E.; KAUFFMAN, P.E. *et al.* Staphylococcal enterotoxin B: Solid-phase radioimmunoassay. *Appl. Microbiol.*, v.22, p.837-841, 1971.
- JOHNSON, H.M.; HALL, H.E.; SIMON, M. Enterotoxin B: serological assay in cultures by passive hemagglutination. *Appl. Microbiol.*, v.15, n.4, p. 815-818, 1967.
- JORDAN, E.O.; DACK, G.M.; WOOPERT, O. The effect of heat, storage, and chlorination on the toxicity of *Staphylococcus* filtrates. *J. Prevent. Med.*, v.5, 383-386, 1931.
- KAJI, Y. & KATO, E. Occurrence of enterotoxigenic staphylococci in household and laboratory dogs. *Jpn. J. Vet. Res.*, v.28, p.86-94, 1980.
- KARINO, E.H.; OKADA, C.; PAULA, C.H. *et al.* Relato de um surto de intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus*, em Paranavaí, PR. *Hig. Alimentar*, v.4, n.2, p.102-105, 1985.
- KATO, E.; KAJI, Y.; KANEKO, K. Enterotoxigenic staphylococci of canine origin. *Am. J. Vet. Res.*, v.39, n.11, p.1771-1778, 1978.
- KATO, E.; KHAN, M.; KUJOVICH, L. *et al.* Production of enterotoxin A. *Appl. Microbiol.*, v.14, p.966-972, 1966.
- KAUFFMAN, P.E. Enzyme immunoassay for staphylococcal enterotoxin A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v.63, n.5, p.1138-1143, 1980.

- KILPPER-BÄLZ, R. & SCHLEIFER, K.H. Transfer of *Peptococcus saccharolyticus* Foubert and Douglas to the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus saccharolyticus* (Foubert and Douglas) comb. nov. *Zbl. Bakt. Infekt. Hyg. I Abt. Orig.*, v.2, p.324-331, 1981. Apud: KLOOS, W.E. Systematics and natural history of *Staphylococci*. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement.*, 25S-37S, 1990.
- KIMBLE, C.E. & ANDERDERSON, A.W. Serological assay of culture filtrates for *Staphylococcus enterotoxin*. *Appl. Microbiol.*, v.25, n.4, p.693-694, 1973.
- KLOOS, W.E. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.34, p.559-592, 1980.
- KLOOS, W.E. Systematics and natural history of *Staphylococci*. 1. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement.*, 25S-37S, 1990.
- KLOOS, W.E. & MUSSELWHITE, M.S. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl. Microbiol.*, v.30, n.3, p.381-395, 1975.
- KLOOS, W.E.; KOPP, U.; ORBAN, B.S. *et al.* Agarose gel electrophoresis and restriction endonuclease analysis of a large of *Staphylococcus* plasmids. *Current Microbiol.*, v.2, p.333-338, 1979.
- KLOOS, W.E.; ORBAN, B.S.; WALKER, D.D. Plasmid composition of *Staphylococcus* species. *Can. J. Microbiol.*, v.27, p.271-278, 1981.
- KLOOS, W.E. & SCHLEIFER, K.H. Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.25, n.1, p.50-61, 1975a.
- KLOOS, W.E. & SCHLEIFER, K.H. Isolation and characterization of *Staphylococci* from human skin. II. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.25, n.1, p.62-79, 1975b.
- KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. *Staphylococcus auricularis* sp. nov.: an inhabitant of the human external ear. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.33, p.9-14, 1983.
- KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, 18A1, (Nom. cons. Opin. 17 Jud. comm. 1958, 153). In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v.2., SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; HOLT, J.G. (ed.). Baltimore, Williams & Williams, 1986.

- KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H.; SMITH, R.F. Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and its subspecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.26, n.1, p.22-37, 1976.
- KLOOS, W.E.; TORNABENE, T.G.; SCHLIFER, K.H. Isolation and characterization of micrococci from human skin, including two new species: *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.24, n.1, p.79-101, 1974.
- KLOOS, W.E.; ZIMMERMAN, R.J.; SMITH, R.F. Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Appl. Environm. Microbiol.*, v.31, n.1, p.53-59, 1976b.
- KLOOS, W.E. & WOLFSHOHL, J.F. Evidence for deoxyribonucleotide sequence divergence between staphylococci living on human and other primate skin. *Current Microbiol.*, v.3, p.167-172, 1979.
- KLOOS, W.E. & WOLFSHOHL, J.F. *Staphylococcus cohnii* subspecies: *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* subsp. nov. and *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.41, n.2, p.284-289, 1991.
- KNIGHTON, H.T. Study of bacteriophage types and antibiotic resistance of staphylococci isolated from dental students and faculty members. *J. Dairy. Res.*, v.39, n.5, p.906-911, 1960.
- KNIGHTON, H.T. Relative constancy of specific bacteriophage patterns of staphylococci isolated from oral and nasal areas. *J. D. Res.*, v.41, n.3, p.701-706, 1962.
- KNIGHTON, H.T. Coagulase-positive Staphylococci in oral and nasal areas of dental students: a four-year study. *J. dent. Res.*, v.44, n.3, p.467-470, 1965.
- KOKAN, N.P. & BERGDOLL, M.S. Detection of low-enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Microbiol.*, v.53, n.11, p.2675-2676, 1987.
- KOPER, J.W.; HAGENAARS, A.M.; NOTERMANS, S. Prevention of cross-reactions in the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin type B in culture filtrates and foods. *J. Food Safety.*, v.2, p.35-45, 1980.
- KOUPAL, A. & DEIBEL, R.H. Rapid qualitative method for detecting staphylococcal nuclease in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.35, n.6, p.1193-1197, 1978.
- KUMAR, A. & GUPTA, R.S. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from foods and human sources. *Ind. Vet. J.*, v.60, p.595-598, 1983.
- KUO, J.K.S. & SILVERMAN, G.J. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in food. *J. Food Protect.*, v.43, n.5, p.404-407, 1980.

- LACHICA, R.V.F.; HOEPRICH, P.D.; GENIGEORGIS, C. Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *Staphylococcus aureus* and other catalase-positive cocci. *Appl. Microbiol.*, v.21, n.5, p.823-826, 1971.
- LACHICA, R.V.F.; HOEPRICH, P.D.; GENIGEORGIS, C. Metachromatic agar-diffusion microslide technique for detecting staphylococcal nuclease in foods. *Appl. Microbiol.*, v.23, n.1, p.168-169, 1972.
- LACHICA, R.V.F.; WEISS, K.F.; DEIBEL, R.H. Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.*, v.18, p.126-127, 1969.
- LANGFORD, M.P.; STANTON, G.J.; JOHNSON, H.M. Biological effects of staphylococcal enterotoxin A on human peripheral lymphocytes. *Infect. Immun.*, v.22, n.1, p.62-68, 1978.
- LANGENEGGER, J.; COELHO, N.M.; LANGENEGGER, C.H. et al. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.5, p.437-440, 1970.
- LAPAGE, S.P. Identification of bacteria by computer: general aspects and perspectives. *J. Gen. Microbiol.*, v.77, n.2, p.273-290, 1973.
- LAURELL, C.-B. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analytical Biochem.*, v.15, p.45-52, 1966.
- LEE, A.C.M.; ROBBINS, R.N.; REISER, R.F. et al. Isolation of specific and common antibodies to staphylococcal enterotoxins B, C and C2. *Infect. Immunity.*, v.27, p.431-434, 1980.
- LENETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER Jr, W.J. et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 3 ed. Washington. American Society for Microbiology, 1980. p.505-515.
- LERONDELLE, C. & POUTREL, B. Characteristics of nonclinical mammary infections of goats. *Ann. Rech. Vet.*, v.15, p.105-112, 1984.
- LOPES, H.R.; NOLETO, A.L.; BERGDOLL, M.S. Production of staphylococcal enterotoxins A, D, and E by sac culture. *J. Food Protect.*, v.54, n.8, p.650-652, 1991.
- LOTTER, L.P. & GENIGEORGIS, C.A. Deoxyribonucleic acid base composition and biochemical properties of certain coagulase-negative enterotoxigenic cocci. *Appl. Microbiol.*, v.29, n.2, p.152-158, 1975.
- LOTTER, L.P. & GENIGEORGIS, C.A. Isolation of coagulase-positive variants from coagulase-negative enterotoxigenic staphylococci. *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I - Orig. Reihe A.*, v.239, p.18-30, 1977.

- MAC FADDIN, J.F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2.ed. Williams & Wilkins. Baltimore, 1980. 527p.
- MALAKI, M.; KOHNEHSHAHRI, M.; GHARAGOZLOO, R. Bacteriophage typing of staphylococci isolated from foodstuffs and food handlers in Tehran. *J. Milk Food Technol.*, v.36, n.5, p.262 - 271, 1973.
- MALLONEE, D.H.; GLATZ, B.A.; PATTEE, P.A. Chromosomal mapping of a gene affecting enterotoxin A production in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.43, n.2, p.397-402, 1982.
- MANDIL, A.; MORAIS, V.A.D.; PEREIRA, M.L. *et al.* *Staphylococcus aureus* em queijo "tipo Minas". *Clénc. Tecnol. Aliment.*, v.2, n.2, p.233-241, 1982.
- MANSFIELD, J.M.; FARKAS, G.; WIENEKE, A.A. *et al.* Studies on the growth and survival of *Staphylococcus aureus* in corned beef. *J. Hyg.*, v.91, p.467-478, 1983.
- MASUD, T.; ALI, A.M.; SHAH, M.A. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy products. *Aust. J. Dairy Technol.*, v.48, p.30-32, 1993.
- MARDH, P.A.; HOVELIUS, B.; NILSSON, P.O. Coagulase negative, novobiocin resistant staphylococci on the skin of animals and man, on meat and in milk. *Acta Vet. Scand.*, v.19, p.243-253, 1978.
- MARÍN, M.A.; ROSA, M.C.; CORNEJO, I. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* strains isolated from spanish dry-cured hams. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, n.3, p.1067-1069, 1992.
- MATTHEWS, K.R. & OLIVER, S.P. Differentiation of *Staphylococcus* species by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *J. Food Protect.*, v.57, n.6, p.486-489, 1994.
- MATHIEU, A.M.; ISIDIGI, B.K.; DEVRIESE, L.A. *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. strains isolated from bovine meat in Zaire. *Int. J. Food Microbiol.*, v.14, p.119-126, 1991.
- MATHIEU, A.M.; ISIDIGI, B.K.; DEVRIESE, L.A. Comparison of two commercial kits for the detection of enterotoxins produced by *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Letters Appl. Microbiol.*, v.14, p.247-249, 1992.
- McCOY, D.W. & FABER, J.E. Influence of food microorganisms on staphylococcal growth and enterotoxin production in meat. *Appl. Microbiol.*, v.14, n.3, p.372-377, 1966.
- McLEAN, R.A.; LILLY, H.D.; ALFORD, J.A. Effects of meat-curing salts and temperature on production of staphylococcal enterotoxin E. *J. Bacteriol.*, v.95, n.4, p.1207-1211, 1968.

- McGINLEY, K.J.; LARSON, E.L.; LEYDEN, J.J. Composition and density of microflora in the subungual space of the hand. *J. Clin. Microbiol.*, v.26, n.5, p.950-953, 1988.
- MELCONIAN, A.K.; FLANDROIS, J-P. FLEURETTE, J. Modified method for production and purification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.45, n.3, p.1140-1143, 1983.
- MENDONÇA, C.P. & SOLÉ-VERNIN, C. Infecções hospitalares causadas por *Staphylococcus aureus* e seus respectivos fagotipos. *Rev. Microbiol.*, v.9, n.3, p.143-149, 1978.
- MERRIL, G.A.; WERNER, R.G.; BRYANT, R.G. Staphylococcal food poisoning associated with an Easter egg hunt. *J. Am. Med. Assoc.*, v.252, p.1019-1022, 1984.
- METZGER, J.F.; JOHNSON, A.D.; COLLINS, W.S. *et al.* *Staphylococcus aureus* enterotoxin B release (excretion) under controlled conditions of fermentation. *Appl. Microbiol.*, v.25, p.770-773, 1973.
- MILLER, B.A.; REISER, R.F.; BERGDOLL, M.S. Detection of staphylococcal enterotoxin A, B, C, D, and E in foods by radioimmunoassay, using staphylococcal cells containing protein A as immunoadsorbent. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.36, n.3, p.421-426, 1978.
- MINOR, T.E. & MARTH, E. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food intoxications. A review. II. Enterotoxins and epidemiology. *J. Milk Food Technol.*, v.35, n.1, p.21-29, 1972.
- MORRISON, R.B. The coagulase test in the identification of pathogenic staphylococci. *J. Appl. Bacteriol.*, v.25, p.432-435, 1962.
- MORSE, S.A. & BALDWIN, J.N. Factors affecting the regulation of staphylococcal enterotoxin B. *Infect. Immun.*, v.7, n.9, p.839-846, 1973.
- MOSSEL, D.A.A. & VAN NETTEN, P. *Staphylococcus aureus* and related staphylococci in foods. *J. Appl. Bacteriol. Supl.*, 1235-1455, 1990.
- MUNCH-PETERSEN, E. Staphylococcal carriage in man. An attempt at a quantitative survey. *Bull. Org. mond. Santé.*, v.24, p.761-769, 1961.
- MULLER, E.E.; FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.A. Isolamento, caracterização e susceptibilidade a antimicrobianos de estafilococos coagulase-positivos (*Staphylococcus aureus* e *intermedius*) de cães com lesões de pele, na região de Londrina, PR. *Semina*, v.7(especial), p.34-37, 1986.
- MUNSON, S.H. & BETLEY, M.J. Partial characterization of a new staphylococcal enterotoxin gene. In: *Abstracts of the 91st General Meeting of the American society for Microbiology*. B6, p.31, 1991.

- MYRICK, B.A. & ELLNER, P.D. Evaluation of the latex slide agglutination test for identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* v.15, p.275-277, 1982.
- NADER FILHO, A., SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ROSSI JUNIOR, O.D. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite tipo B. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.35, n.5, p.621-629, 1983.
- NADER FILHO, A., SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ROSSI JUNIOR, O.D. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite gordura 3,2%. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.36, n.5, p.549-558, 1984.
- NADER FILHO, A., SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ROSSI JUNIOR, O.D. *et al.* Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, v.5, n.2, p.53-56, 1985.
- NANU, E. & NARAYAN, K.G. Enterotoxin production by staphylococci isolated from pork kabab, salami and other sources by ELISA. *J. Food Sci. Technol.*, v.29, n.4, p.383-384, 1992.
- NISKANEN, A. & KOIRANEN, L. Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources. *J. Food Protect.*, v.40, p.543-548, 1977.
- NISKANEN, A. & KOIRANEN, L.; ROINE, K. Staphylococcal enterotoxin and thermonuclease production during induced bovine mastitis and the clinical reactions of enterotoxin in udders. *Infect. Immun.*, v.19, p.493-498, 1978.
- NOBLE, W.C.; WILLIAMS, R.E.O.; JEVONS, M.P. *et al.* Some aspects of nasal carriage of staphylococci. *J. Clin. Path.*, v.17, n.79-83, 1964.
- NOBLE, W.C. Systematics and natural history of Staphylococci. 2. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Supplement.*, v.39S-48S, 1990.
- NOLETO, A.L.S. & TIBANA, A. Outbreak of staphylococcal enterotoxin B food poisoning. *Rev. Microbiol.*, v.18, n.2, p.144-145, 1987.
- NOSKOVA, V.P.; EZEPCHUK, Y.V.; NOSKOV, A.N. Topology of the functions in molecule of staphylococcal enterotoxin type A. *Int. Biochem.*, v.16, n.2, p.201-206, 1984.
- NOTERMANS, S.; BOOT, R.; TIPS, P.D. *et al.* Extraction of staphylococcal enterotoxins (SE) from minced meat and subsequent detection of SE with enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Food Protect.*, v.46, n.3, p.238-241, 1983.

- NOTERMANS, S.; VERJANS, H.L.; BOL, J.; *et al*. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of *Staphylococcus aureus* enterotoxin type B. *Health Lab. Sci.*, v.15, n.1, p.28-31, 1978.
- NOTERMANS, S. & WERNARS, K. Immunological methods for detection on foodborne pathogens and their toxins. *Int. J. Food Microbiol.*, v.12, p.91-102, 1991.
- NUNEZ, M.; MARTINEZ-MORENO, J.L.; MEDINA, A.L. Ensayo de diversas cepas de *Streptococcus lactis* de diversa capacidade adidificante como fermentos para queso tipo Manchego. *An. INIA. Ser. Ganadera*, v.12, p.65-72, 1981. Apud: OTERO, A.; GARCIA, M.C.; GARCIA, M.L. *et al*. Behaviour of *Staphylococcus aureus* strains FRI 137 and FRI 361 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *Int. Dairy Journal*, v.3, p.85-96, 1993.
- ODA, T.; OHKUBO, T.; NAGAI, M. *et al*. Detection of staphylococcal enterotoxins in food by reversed passive latex agglutination test. *Annu. Rep. Fukuoka City Hyg. Lab.*, v.4, p.33-37, 1979. Apud: FUJIKAWA, H. & IGARASHI, H. Rapid latex agglutination test for detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.54, n.10, p.2345-2348, 1988.
- O'DONNELL, E. Spotlight on silage. *Food Manufacture*, v.68, n.10, p. 42 e 48, 1993.
- OGSTON, A. Report upon microorganisms in surgical diseases. *Brit. Med. J.*, v.1, p.369-375, 1981. Apud: BAIRD-PARKER, A.C. The staphylococci - an introduction. *J. Appl. Bacteriol. Suppl.*, 1S-8S, 1990.
- OKOJI, C.N.; INGLIS, B.; STEWART, P.R. Potencial problems in the use of oligonucleotide probes for staphylococcal enterotoxin genes. *J. Appl. Bacteriol.*, v.74, n.6, p.637-644, 1993.
- OLIVEIRA, A.M. *Estafilococos enterotoxigênicos: pesquisa de cepas produtoras e baixo produtoras de enterotoxinas isoladas de leite cru de bovino*. (Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP - SP). 1995. 90p.
- OLIVEIRA, K.M.P.; NISHIYAMA, E.K.; SEGAWA, K.A. *et al*. *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus epidermidis* enterotoxigênicos isolados de manipuladores de alimentos. In: *Congresso Brasileiro de Microbiologia*, 18, Santos, p.37, 1995. Anais do...
- OLSON, J.C.; CASMAN, E.P.Jr.; BAER, E.F. *et al*. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* cultures isolated from acute cases of bovine mastitis. *Appl. Microbiol.*, v.20, p.605-607, 1970.
- OLSVIK, Ø.; FOSSUM, K.; BERDAL, B.P. Staphylococcal enterotoxin A, B, and C produced by coagulase-negative strains within the family *Micrococcaceae*. *Acta Pathol. Immunol. Scand. Sect. B.*, v.B90, p.441-444, 1982.

- OMORI, G. & KATO, Y. A staphylococcal food-poisoning caused by a coagulase negative strain. *Biken's J.*, v.2, p.92, 1959.
- OTERO, A.; GARCIA, M.C.; GARCIA, M.L. *et al* Behaviour of *Staphylococcus aureus* strains FRI 137 and FRI 361 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *Int. Dairy Journal*, v.3, p.85-96, 1993.
- OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, v.32, p.231-240, 1949.
- OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, v.29, p.231-240, 1953.
- LOUDIN, J. Specific precipitation in gels. *Methods Med. Res.*, v.5, p.333-378, 1952.
- PARISI, J.T.; LAMPSON, B.C.; HOOVER, D.L. *et al*. Comparison of epidemiologic markers for *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.*, v.24, p.56-60, 1986.
- PARK, C.E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M.K. Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, n.8, p.2509-2512, 1992.
- PARK, C.E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M.K. Simple solution to false-positive staphylococcal enterotoxins assays with seafood tested with an enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA). *Appl. Environ. Microbiol.*, v.59, n.7, p.2210-2213, 1993.
- PARK, C.E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M.K. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay kit (RIDASCREEN) for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D, and E in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.60, n.2, p.677-681, 1994.
- PARK, C.E.; EL DEREHA, H.B.; RAYMAN, M.K. Evaluation of staphylococcal thermonuclease (TNase) assay as means of screening foods for growth of staphylococci and possible enterotoxin production. *Can. J. Microbiol.*, v.24, p.1135-1139, 1978.
- PARK, C.E.; SERRANO, A.M. *et al*. A survey of microorganisms for the thermonuclease production. *Can. J. Microbiol.*, v.26, n.4, p.532-535, 1980.
- PARK, C.E. & SZABO, R. Evaluation of the reversed passive latex agglutination (RPLA) test kit for detection of staphylococcal enterotoxin A, B and C in foods. *Can. J. Microbiol.*, v.32, p.723-727, 1986.
- PARKER, M.E. & WILLIAMS, H. Cross-infection and cross-contamination. - The relationship between subungual bacteria and fingernail length. *Dental Hyg.*, v.61, n.2, p.68-72, 1987.

- PARSONNET, J.; MILLS, J.T.; GILLIS, Z.A. *et al.* Competitive, enzyme-linked immunosorbent assay for toxic shock syndrome toxin 1. *J. Clin. Microbiol.*, v.22, n.1, p.26-31, 1985.
- PATTEE, P.A. GLATZ, B.A. Identification of a chromosomal determinant of enterotoxin A production in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.39, n.1, p.186-193, 1980.
- PAYNE, D.N. & WOOD, J.M. The incidence of enterotoxin production in strains of *Staphylococcus aureus* from foods. *J. Appl. Bacteriol.*, v.37, p.502-505, 1974.
- PEREIRA, J.L. Estudo do comportamento de linhagens de *S.aureus* baixo produtoras de enterotoxina tipo D em meio de hidrolisado proteico, creme de confeitaria e presunto cozido. (Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP - SP), 1990. 123p.
- PEREIRA, J.L.; SALSBERG, S.P.; BERGDOLL, M.S. Effect of temperature, pH and sodium chloride concentrations on production of staphylococcal enterotoxins A and B. *J. Food Protect.*, v.45, n.14, p.1306-1309, 1982.
- PEREIRA, J.L.; SALSBERG, S.P.; BERGDOLL, M.S. Production of staphylococcal enterotoxin D in foods by low-enterotoxin-producing staphylococci. *Int. J. Food Microbiol.*, v.14, p.19-26, 1991a.
- PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; LARA, M.A. *et al.* Enterotoxigenic staphylococci from food handlers working in an industrial kitchen in Belo Horizonte, MG (Brazil). *Rev. Microbiol.*, v.25, n.3, p.161-165, 1994a.
- PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J. *et al.* Staphylococcal food poisoning from cream-filled cake in a metropolitan area of South-Easter in Brazil. *Rev. Saúde Pública*, v.28, n.6, p.406-409, 1994b.
- PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J. *et al.* Staphylococci in breast milk from women with and without mastitis. *Rev. Microbiol.*, v.2, n.2, p.117-120, 1995.
- PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J. *et al.* Staphylococci from healthy dental students. *Rev. Saúde Pública*, 1996a (submetido).
- PEREIRA, M.L.; HENEINE, L.G.D.; SANTOS, E.J. *et al.* Prevention of nonspecific reactions on reversed passive latex agglutination assay (RPLA) for detecting low amounts of staphylococcal enterotoxins. *Rev.Lat.-Amer. Microbiol.*, 1996b (submetido).
- PEREIRA, M.L.; LARA, M.A.; DIAS, R.S. *et al.* Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo "Tipo Minas". *Rev. Microbiol.*, v.22, n.4, p.349-350, 1991b.

- PIOCHI, B.J.A. & ZELANTE, F. Contribuição para o estudo de *Staphylococcus* isolados da cavidade bucal. I - *Staphylococcus* isolados da saliva. *Rev. Fac. Odont. S. Paulo*, v.11, n.2, p.367-378, 1973.
- PIVNICK, H.; BARR, T.R.B.; ERDMAN, I.E. *et al.* Staphylococcal food poisoning from barbecued chicken. *Can. J. Public Health*, v.59, p.30-31, 1968.
- PHILLIPS, W.E.JR. & KLOOS, W.E. Identification of coagulase-positive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* isolates from veterinary clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, v.14, n.6, p.671-673, 1981.
- PORTO, E. & SILVA, E.N. *Staphylococcus aureus* em abatedouro industrial de frangos: origem, disseminação e resistência térmica de cepas isoladas de carcaças. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.47, n.3, p.417-433, 1995.
- POUTREL, B. Udder infection of goats by coagulase negative Staphylococci. *Vet. Microbiol.*, v.9, p.131-137, 1984.
- RADDI, M.S.G.; LEITE, C.Q.F.; MENDONÇA, C.P. *Staphylococcus aureus* portadores entre manipuladores de alimentos. *Rev. Saúde públ.*, v.22, n.1, p.36-40, 1988.
- RANELLI, D.M.; JONES, C.L.; JOHNS, M.B. *et al.* Molecular cloning of staphylococcal enterotoxin B gene in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.82, p.5850-5854, 1985.
- RAYMAN, M.K.; PARK, C.E.; PHILPOTT, J. *et al.* Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as means of identifying *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.*, v.29, n.4, p.451-454, 1975.
- REA, M.; O'CONNOR, F.; DALY, C. *et al.* Biochemical characteristics and enterotoxigenicity of *S.aureus* isolates from bovine mastitis. *Int. J. Food Sci. Technol.*, v.4, p.44-55, 1980.
- REED, G.H. Guidelines for satisfactory food protection and sanitation practices. *Dairy, Food Environ. Sanitation*, v.9, n.7, p.365-368, 1989.
- REISER, R.F.; CONAWAY, D.; ULMANN, E.F. Detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Appl. Microbiol.*, v.27, p.83-85, 1974.
- REISER, R.F.; ROBBINS, R.N.; KHOE, G.P. *et al.* Purification and some physicochemical properties of toxic shock toxin. *Biochemistry*, v.22, p.3907-3912, 1983.
- REISER, R.F.; ROBBINS, R.N.; NOLETO, A.L. *et al.* Identification, purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C3. *Infect. Immun.*, v.45, p.625-630, 1984.

- REISER, R.F. & WEISS, K.F. Production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C in various media. *Appl. Microbiol.*, v.18, n.6, p.1041-1043, 1969.
- REN, K.; BANNAN, J.; FISCHETTI, V.A. *et al.* Sequence and structural characterization of a new enterotoxin, SEF1 from *Staphylococcus aureus*. 93rd General Meeting, Atlanta, 1993. B-213. Apud: BHATTI, A.R.; SIDIQI, Y.M.; MICUSAN, V.V. Highly sensitive fluorogenic enzyme-linked immunosorbent assay: detection of staphylococcal enterotoxin B1. *J. Microbiol. Methods.*, v.19, p.179-187, 1994.
- ROBBINS, R.N.; GOULD, S.; BERGDOLL, M.S. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Microbiol.*, v.28, p.946-950, 1974.
- ROSE, S.A.; BANKES, P.; STRINGER, M.F. Detection of staphylococcal enterotoxins in dairy products by the reversed passive latex agglutination (SET-RPLA) Kit. *Int. J. Food Microbiol.*, v.8, p.65-72, 1989.
- ROSENBACH, F.J. Mikroorganismen bei den wundinfektionskrankheiten des Menschen. BERGMAN, J.F., Wiesbaden, Germany. Apud: BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M.P. (ed). *Foodborne bacterial pathogens*. INC, New York, 1989. p.463-523.
- SABIONI, J.G.; HIROOKA, E.Y.; SOUZA, M.L.R. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. *Rev. Saúde públ.*, v.22, n.5, p.458-461, 1988.
- SALOMON, L.L. & TEW, R.W. Assay of staphylococcal enterotoxin B by latex agglutination. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.129, p.539-542, 1968.
- SALVADOR, S.L.S.; BARACCHINI, O.; ITO, I.Y. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* na saliva, orofaringe e fossas nasais de indivíduos sadios. *Rev. Microbiol.*, v.20, n.2, p.165-169, 1989.
- SANDERS, A.C. Report on microbiological methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v.57, p.312-314, 1974.
- SANJEEV, S. & SURENDRAN, P.K. Evaluation of reversed passive latex test kits for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, and D in fishery products. *J. Fd. Sci. Technol.*, v.29, n.5, p.311-312, 1992.
- SANKARAN, R. & LEELA, R.K. Prevalence of enterotoxigenic staphylococci in bakery products. *J. Food Protect.*, v.46, p.95-97, 1983.
- SANTOS, E.S. & GENIGEORGIS, C. Survival and growth of *S. aureus* in commercial manufactured Brazilian Minas cheese. *J. Food Protect.*, v.44, p.177-184, 1981.

- 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. Food Protect.*, v.44, p.172-176, 1981.
- SAUNDERS, G.C. & BARTLETT, M.L. Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.34, p.518-522, 1977.
- SCHEUSNER, D.L. & HARMON, L.G. Growth and enterotoxin production by various strains of *Staphylococcus aureus* in selected foods. *J. Food Sci.*, v.38, p.474-476, 1973.
- SCHLEIFER, K.H. & FISHER, U. Description of a new species of the genus *Staphylococcus* *Staphylococcus carnosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.32, p.153-156, 1982.
- SCHLEIFER, K.H.; GEYER, U.; KILPPER-BÄLZ, R. *et al.* Elevation of *Staphylococcus sciuri* subsp. *lentus* (Kloos *et al.*) to species status: *Staphylococcus lentus* (Kloos *et al.*) comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.4, p.382-387, 1983.
- SCHLEIFER, K.H.; KILPPER-BÄLZ, R.; DEVRIESE, L.A. *Staphylococcus arlettae* sp. nov., *S. equorum* sp. nov., and *S. kloosii* sp. nov.: three new coagulase-negative, novobiocin-resistant species from animals. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.5, p.501-509, 1984.
- SCHLEIFER, K.H.; KILPPER-BÄLZ, R.; FISHER, U. *et al.* Identification of *Micrococcus candidus* ATCC 14852 as a strain of *Staphylococcus epidermidis* and of *Micrococcus caseolyticus* ATCC 13548 and *Micrococcus varians* ATCC 29750 as members of a new species, *Staphylococcus caseolyticus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.32, p.15-20, 1982.
- SCHLEIFER, K.H. & KLOOS, W.E. Isolation and characterization of Staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.25, n.1, p.50-61, 1975.
- SCHLEIFER, K.H. & KROPPESTEDT, R.M. Chemical and molecular classification of staphylococci. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement.*, 9S-24S, 1990.
- SCHLIEVERT, P.M.; SHANDS, K.N.; DAN, B.B. *et al.* Identification and characterization of an enterotoxin from *Staphylococcus aureus* associated with toxic shock syndrome. *J. Infect. Dis.*, v.143, p.509-516, 1981.
- SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCHMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of growth, Incases and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Int. J. Food Microbiol.*, v.11, p.1-20, 1990.

- SHAHER, W.M. & IAN DOLO, J.J. Staphylococcal enterotoxin A: a chromosomal gene product. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.36, n.2, p.389-391, 1978.
- SHEIKH, M.I. & LUEDECKE, L.O. *Staphylococcus aureus* in commercially processed fluid dairy and non-dairy products. *J. Milk Food Technol.*, v.37, n.6, p.329-332, 1974.
- SHELDRAKE, R.I.; HOARE, T.R.J.; WOODHOUSE, V.E. Relationships of somatic cell count and cell volume analysis of goat's milk to intra-mammary infection with coagulase-negative staphylococci. *J. Dairy Res.*, v.48, p.393-403, 1981.
- SHIOZAWA, K.; KATO, E.; SHIMIZU, A. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from chickens. *J. Food Protect.*, v.43, n.9, p.683-685, 1980.
- SILVERMAN, S.J. Serological assay of culture filtrates for *Staphylococcus* enterotoxin. *J. Bacteriol.*, v.85, p.955-956, 1963.
- SILVERMAN, S.J.; KNOTT, A.R.; HOWARD, M. Rapid, sensitive assay for staphylococcal enterotoxins and a comparison of serological methods. *Appl. Microbiol.*, v.16, n.7, p.1019-1023, 1968.
- SMITH, G.S. & JOHNSON, H.M. The effect of staphylococcal enterotoxins on the primary in vitro immune response. *J. Immunol.*, v.115, n.2, p.575-578, 1975.
- SMITH, H.B.H. & FARKAS-HIMSLEY, H. The relationship of pathogenic coagulase-negative *Staphylococci* to *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Microbiol.*, v.15, p.879-890, 1969.
- SMITH, J.L.; BUCHANAN, R.L.; PALUMBO, S.A. Effect of food environmental on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. *J. Food Protect.*, v.46, n.6, p.545-555, 1983.
- SMITH, M.C. & ROGUINSKI, M. Mastitis and other diseases of the goat's udder. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.171, p.1241-1248, 1977.
- SOARES, M.J.S.; LIMA-VERDE, V.; NOLETO, A.L.S. et al. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos e resistentes à metilicina em manipuladores de alimentos. In: *Congresso Brasileiro de Microbiologia*, 18, Santos, p.27, 1995. Anais do...
- SOUREK, J. Circulation of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in humans and their environments. *J. Hyg, Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, v.24, n.2, p.183-191, 1980.
- SPERBER, W.H. & TATINI, S.R. Interpretation of the coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.*, v.29, n.4, p.502-505, 1975.

- SPERO, L.; GRIFFIN, B.Y.; MIDDLEBROOK, J.L. *et al.* Effect of single and double peptide bond scission by trypsin on the structure and activity of staphylococcal enterotoxin C. *J. Biol. Chem.*, v.251, n.18, p.5580-5588, 1976.
- SPERO, L.; WARREN, J.; METZGER, I.F. Effect of single peptide bond scission by trypsin on structure and activity of staphylococcal enterotoxin B. *J. Biol. Chem.*, v.240, p.7279-7294, 1973.
- STEELE, J. E. & STILES, M.E. Food poisoning potential of artificially contaminated vacuum packaged sliced ham in sandwiches. *J. Food Protect.*, v.44, p.430-434, 1981.
- STIFFLER-ROSENBERG, G. & FEY, H. Simple assay for staphylococcal enterotoxins A, B, and C: modification of enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, v.8, p. 473-479, 1978.
- SU, Y-C. & WONG, A.C.L. Optimal condition for the production of unidentified staphylococcal enterotoxins. *J. Food Protect.*, v.56, n.4, p.313-316, 1993.
- SU, Y-C & WONG, A.C.L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.61, n.4, p.1433-38, 1995.
- Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci: Minutes of first meeting. Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.15, p.107-108, 1965.
- SURGALLA, M.J.; BERGDOLL, M.S.; DACK, G.M. Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey-feeding test. *J. Lab. Clin. Med.*, v.41, p.782-788, 1953.
- SURGALLA, M.J.; KADANY, J.D.; BERGDOLL, M.S. *et al.* Staphylococcal enterotoxin: production methods. *J. Infect. Dis.*, v.89, p.180-184, 1951.
- TATINI, S.R. Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. *J. Milk Food Technol.*, v.36, n.11, p.559-563, 1973.
- TATINI, S.R.; CORDS, B.R.; GRAMOLL, J. Screening for staphylococcal enterotoxins in food. *Food Technol.*, v.30, p.64-74, 1976.
- TATINI, S.R.; SOO, H.M.; CORDS, B.R. *et al.* Heat-stable nuclease for assessment of staphylococcal growth and likely presence of enterotoxins in foods. *J. Food Sci.*, v.40, p.352-356, 1975.
- TATINI, S.R.; WESALA, W.D.; JEZESKI, J.J. *et al.* Production of staphylococcal enterotoxin A in Blue, Brick, Mozzarella, and Swiss cheese. *J. Dairy Sci.*, v.56, p.429-435, 1973.

- THATCHER, F.S.; COMTOIS, R.D.; ROSS, D. *et al.* Staphylococci in cheese: some public health aspects. *Can. J. Public. Health.*, v.50, p.479-503, 1959.
- THATCHER, F.S. & SIMON, W.A. Comparative appraisal of the properties of "staphylococci" isolated from clinical sites and from dairy products. *Can. J. Microbiol.*, v.2, p.703-714, 1956.
- THATCHER, F. S. & MATHESON, B.H. Studies with staphylococcal toxins. II. The specificity of enterotoxin. *Can. J. Microbiol.*, v.1, p.382-400, 1955.
- TODD, E.C.D. Foodborne disease in Canada - a 5-year summary. *J. Food Protect.*, n.7, v.46, p.650-657, 1983.
- TODD, E.C.D. Foodborne and waterborne disease in Canda - 1979. Annual summary. *J. Food Protect.*, v.48, n.12, p.1071-1078, 1985.
- TODD, E.C.D. Costs of acute bacterial foodborne disease in Canada and the United States. *Int. J. Food Microbiol.*, v.9, p.313-326, 1989.
- THOMPSON, N.E.; GOMES, L.E.; BERGDOLL, M.S. Incidence of antibodies reactive with toxic shock syndrome toxin-1 in bovine milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.151, n.4, p.865-867, 1988.
- TRANter, H.S. Foodborne illness. Foodborne staphylococcal illness. *Lancet.*, v.27, p.1044-1046, 1990.
- TURNER, F.J.; SCHWARTZ, B.S.; MORRIS PLAINS, N.J. The use of a lyophilized human plasma standardized for blood coagulation factors in the coagulase and fibrinolytic tests. *J. Lab. Clin. Med.* v.52, n.6, p.888-894, 1958.
- UMEKI, F.; OTSUKA, G.; YOSHIDA, M. *et al.* Evaluation of acid production from carbohydrates and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* in bovine quarter milk. *Milchwissenschaft*, v.48, n.1, p.22-25, 1992.
- UNTERMAN, F. Contribution to the occurrence of enterotoxin producing staphylococci in man. *Zbl. Bakt. I. Orig. A.*, v.222, p.18-26, 1972.
- UNTERMAN, F. & MÜLLER, C. Influence of aw value and storage temperaure on the multiplication and enterotoxin formation of staphylococci in dry-cured hams. *Int. J. Food Microbiol.*, v.16, p.109-115, 1992.
- VALLE, J.; GOMEZ-LUCIA, E.; PIRIZ, S. *et al.* Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.56, n.5, p.1323-1326, 1990.

- VALLE, J.; GOMEZ-LUCIA, E.; PIRIZ, S. *et al.* Staphylococcal enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) production during induced goat mastitis. *J. Food Protect.*, v.54, n.4, p.267-271, 1991.
- VANDENBOSCH, L.L.; FUNG, D.Y.C.; WIDOMSKI, M. Optimum temperature for enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* 3-6 and 137 in liquid medium. *Appl. Microbiol.*, v.25, n.3, p.498-500, 1973.
- VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association. 3 ed. Washington, DC., 1992. 1219p.
- VARADARAJ, M.C & RANGANATHAN, B. Staphylococcal enterotoxins - methods of production and detection - a review. *Indian J. Dairy Sci.*, v.42, n.2, p.267-276, 1989.
- VARALDO, P.E.; KILPPER-BÄLZ, R.; BIAVASCO, F. *et al.* *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.38, p.436-439, 1988.
- VEIT, P. Les intoxications alimentaires d'origine microbienne. *Cah. Nutr. Diét.*, v.12, n.2, p. 125-130, 1987.
- VITOR, R.; LACHICA, F.; WEISS, K.F. *et al.* Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.*, v.18, n.1, p.126-127, 1969.
- YAMADA, S.; IGARASHI, H.; TERAYAMA, T. Improved reversed passive hemagglutination for simple and rapid detection of staphylococcal enterotoxins A - E in food. *Microbiol. Immunol.*, v.21, n.12, p.675-682, 1977.
- WEED, L.A.; MICHAEL, A.C.; HARGER, R.N. Fatal staphylococcus intoxication from goat milk. *Am. J. Publ. Health.*, v.33, p.1314-1318, 1943.
- WHEELOCK, V. Bacterial food-borne disease - a major issue for the food industries. *Brit Food J.*, v.90, n.2, p.58-64, 1988.
- WIENEKE, A.A. Enterotoxin production by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods and human beings. *J. Hyg.*, v.73, p.235-262, 1974.
- WIENEKE, A.A. & GILBERT, R.J. Comparison of four methods for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.*, v.4, p.135-143, 1987.

- WINDEMANN, H.; JÜRG, L.; MAURER, M. ELISA with enzyme amplification for sensitive detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, v.8, p.25-34, 1989.
- WILLIAMS, R.E.O. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev.*, v.27, p.56-71, 1963.
- WILLIAMSON, D.M.; GRAVANI, R.B.; LAWLESS, H.T. Correlating food safety knowledge with home food-preparation practices. *Food Technol.*, v.46, n.5, p.94-100, 1992.
- WILSON, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em leite a ser pasteurizado. *Rev. Saúde públ.*, v.11, p.1-11, 1977.
- WINSLOW, C-E.A. & ROTHBERG, W.; PARSONS, E.I. Notes on the classification of white and orange staphylococci. *J. Bacteriol.*, v.5, p.145-168, 1920.
- WINSLOW, C-E.A. & WINSLOW, A.R. The systematic relationships of the *Coccaceae*. WILEY, J., New York, 1908. Apud: BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M.P. (ed). *Foodborne bacterial pathogens*. INC, New York, 1989. p.463-523.
- WYATT, C.J. & GUY, V.H. Growth of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in retail pumpkin pie. *J. Food Protect.*, v.44, p.418-421, 1981.
- ZAYATZ, A.E.K. & LEDFORD, R.A. Characteristics of acid-injury and recovery of *Staphylococcus aureus* in a model system. *J. Food Protect.*, v.48, p.616-620, 1985.
- ZEHREN, V.L. & ZEHREN, V.F. Examination of large quantities of cheese for staphylococcal enterotoxin A. *J. Dairy Sci.*, v.51, p.635-644, 1968.
- ZELANTE, F.; ASHCAR, H.; PIOCHI, B.J.A. et al. *Staphylococcus aureus* na boca e no nariz de indivíduos sãos. Verificação de identidade entre as cepas isoladas. *Rev. Saúde públ.*, v.16, p.92-96, 1982.

Quinze exemplares impressos a laser,
em papel Golfrata, 90g/m², A4 (210 x 297mm),
cor cinza, da Filperson Indústria de Papéis Especiais Ltda.
Arte gráfica e impressão a cargo de *Maria Lúcia Pereira*
Rua dos Expedicionários, nº 453
31555-200 Belo Horizonte - MG
Telefax: (031) 443 16 32

Primavera de 1996.