

INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE ESTAFILOCOCOS ENTEROTOXIGÊNICOS COAGULASE NEGATIVOS, EM ALIMENTOS

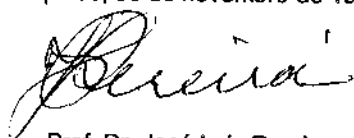
ANA MARIA DE OLIVEIRA
Bióloga

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Ana Maria de Oliveira, aprovada pela Comissão Julgadora em 03 de novembro de 1999.

Prof. Dr. José Luiz Pereira
Orientador

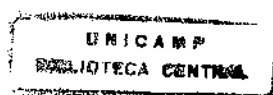
Campinas, 03 de novembro de 1999



Prof. Dr. José Luiz Pereira
Presidente da Banca

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos,
UNICAMP, para a obtenção do grau de Doutor em Ciência de
Alimentos.**

CAMPINAS
Estado de São Paulo – Brasil
Setembro/1999



BC

39561

199

D ☒

11.00

-11-99

00137456-5

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

OL4i

Oliveira, Ana Maria de
Investigação do comportamento de estafilococos
enterotoxigênicos coagulase negativos em alimentos / Ana
Maria de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 1999.

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

1. Enterotoxinas. 2. Intoxicação alimentar.
3. Staphylococcus chromogenes. I. Pereira, José Luiz.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. Título.

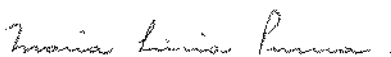
BANCA EXAMINADORA



Professor Dr. José Luiz Pereira
(Orientador/Presidente)



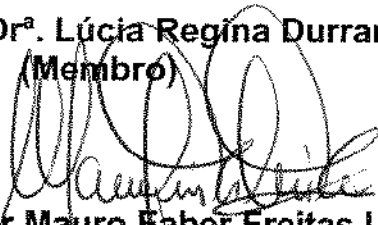
Professora Drª. Sonia Presa C. de Salzberg
(Membro)



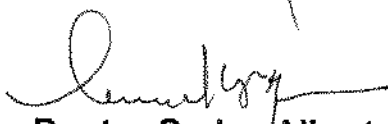
Drª. Maria Lúcia Pereira
(Membro)

Professora Drª. Pilar Rodriguez de Massaguer
(Membro)

Professora Drª. Lúcia Regina Durrant
(Membro)



Professor Doutor Mauro Faber Freitas Leitão
(Membro)



Professor Doutor Carlos Alberto de Magalhães Lopes
(Membro)

Campinas, de novembro de 1999.

*Na infinidade da vida onde estou, tudo é perfeito,
pleno e completo, e no entanto a vida está sempre mudando.*

*Não existe começo nem fim,
somente um constante ciclar e reciclar
de substâncias e experiências.*

*A vida nunca está emperrada, estática ou rançosa,
pois cada momento é sempre novo e fresco.*

*Eu sou uno com o Poder que me criou e esse Poder
me deu o poder de criar minhas próprias circunstâncias.*

*Regozijo-me no conhecimento de que tenho o poder
de minha própria mente para usar de qualquer forma que eu escolher.*

*Cada momento da vida é um novo ponto de começo
à medida que nos afastamos do velho.*

*Esse momento é um novo ponto
de começo para mim bem aqui e agora mesmo.*

Tudo está bem no meu mundo.

Louise Hay

**Aos meus pais,
Luiz Paes de Oliveira e Inês Aparecida de Oliveira,
Minha gratidão pela presença constante.**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

**Ao Dr. José Luiz Pereira, professor de Microbiologia de Alimentos do
Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas, pela orientação, dedicação e amizade.**

**Para Norma Teruko Nago Miya,
amiga em todos os momentos.**

À Entidade CNPQ (Conselho Nacional de Pesquisa), pela bolsa de estudos concedida, processo Nº 141341/95-5,

À Entidade FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo financiamento do projeto, processo Nº 97/04824-3,

À FAEP (Fundo de Apoio ao Ensino e a Pesquisa), pelo auxílio concedido para a finalização da tese,

À Maria Helena de Sousa, do CEPEMIG – UNICAMP, pela realização da análise estatística,

À Profª. Drª Hilary Castle de Menezes, pela tradução do texto em inglês,

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e sugestões oferecidas,

À Rosa Maria, do laboratório de termobacteriologia, FEA, UNICAMP, pela convivência sincera e amizade,

Aos funcionários da secretária do Departamento de Ciência de Alimentos e secretária de pós-graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP,

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp, em especial a Creuza Kasume Nomura, pela correção das referências bibliográficas,

A todos do laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de
Ciência de Alimentos, FEA, Unicamp,

Aos meus queridos amigos e professores da Faculdade de Engenharia de
Alimentos, UNICAMP,

Muito Obrigada.

ÍNDICE

Índice de Tabelas.....	i
Índice de Figuras.....	ii
Resumo.....	iv
Abstract.....	vi
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - OBJETIVOS.....	4
1.1.1 -Objetivo Geral.....	4
1.1.2- Objetivos Específicos.....	5
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 – Taxonomia.....	6
2.2 – Características dos Estafilococos.....	7
2.3 – Enterotoxinas Estafilocócicas.....	9
2.4 – Mecanismo de Ação das Enterotoxinas.....	12
2.5 – Detecção de Enterotoxinas.....	14
2.6 – Relatos Epidemiológicos.....	16
2.7 – Produção de Enterotoxinas por Outras Espécies de Estafilococos.....	17
2.8 – Estafilococos em Alimentos.....	19
2.9 – Estafilococos em Portadores Humanos.....	21
2.10 – Estafilococos em Animais.....	22
3 – MATERIAL E MÉTODO.....	24

3.1 –MATERIAL.....	24
3.1.1 – Linhagens de Estafilococos Estudadas.....	24
3.1.2 – Alimentos Empregados para o Estudo.....	25
3.1.3 – Meios de Cultivo Laboratorial e Reagentes.....	25
3.1.4 – Equipamentos.....	25
3.2 – MÉTODO.....	26
3.2.1 – Confirmação da Produção de Enterotoxinas pelas Linhagens Coagulase Negativas, em Condições de cultivo Laboratorial.....	26
3.2.2 – Identificação das Linhagens de Estafilococos Coagulase Negativos, em Estudo.....	26
3.2.3 – Estudo do Comportamento de Linhagens de Estafilococos Coagulase Negativas , em Alimentos Experimentalmente Inoculados.....	27
3.2.4 – Contagem da Microbiota Mesófila e Estafilococos nas Amostras de Alimentos.....	29
3.2.5 – Detecção de Enterotoxinas Produzidas pelas Linhagens de Estafilococos Coagulase Negativos, em Alimentos.....	30
3.2.6 – Análise Estatística.....	35
4 – RESULTADOS	36
4.1 – Identificação das Linhagens de Estafilococos Coagulase Negativas Estudadas.....	36
4.2 – Contagem Inicial de Microrganismos nas Amostras Controle dos Alimentos.....	39
4.3 – Comportamento das Linhagens de Estafilococos Coagulase Negativas, em Alimentos.....	40

4.3.1 – Em Leite em Pó Reconstituído.....	40
4.3.2 – Em Presunto Cozido.....	41
4.3.3 – Em Creme de Confeitaria.....	42
4.4 – Estudo Descritivo dos Dados Obtidos.....	50
4.5 – Estudo Analítico dos Dados.....	60
4.6 – Produção e Detecção de Enterotoxinas nos Alimentos pelas Linhagens Estudadas.....	67
5 – DISCUSSÃO.....	72
6 – CONCLUSÕES.....	81
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01 – Características bioquímicas das dez linhagens de estafilococos estudadas.....	38
Tabela 02 – Identificação de linhagens de estafilococos coagulase negativas isolados de leite bovino e manipuladores de alimentos e respectivas enterotoxinas produzidas em condições de cultivo laboratorial.....	39
Tabela 03 – Média da contagem de microrganismos mesófilos em PCA e estafilococos em BP nas amostras controle dos alimentos (leite, presunto e creme de confeitaria).....	40
Tabela 04 – Comportamento de estafilococos coagulase negativos inoculados (10^3 UFC/mL) e contagem de mesófilos em leite em pó desnatado mantidos em 25, 30 e 37°C, após 12 e 24 horas de incubação.....	44
Tabela 05 – Comportamento de estafilococos coagulase negativos inoculados (10^3 UFC/mL) e contagem de mesófilos em leite em pó desnatado mantidos em 25, 30 e 37°C, após 48 e 72 horas de incubação.....	45
Tabela 06 – Comportamento de estafilococos coagulase negativos inoculados (10^3 UFC/mL) e contagem de mesófilos em presunto mantidos em 25, 30 e 37°C, após 12 e 24 horas de incubação.....	46
Tabela 07 – Comportamento de estafilococos coagulase negativos inoculados (10^3 UFC/mL) e contagem de mesófilos em presunto cozido mantidos em 25, 30 e 37°C, após 48 e 72 horas de incubação.....	47
Tabela 08 – Comportamento de estafilococos coagulase negativos inoculados (10^3 UFC/mL) e contagem de mesófilos em creme de confeitaria mantidos em 25, 30 e 37°C, após 12 e 24 horas de incubação.....	48

Tabela 09 – Comportamento de estafilococos coagulase negativos inoculados (10 ³ UFC/mL) e contagem de mesófilos em creme de confeitaria mantidos em 25, 30 e 37°C, após 48 e 72 horas de incubação.....	49
Tabela 10 – Valores descritivos do logaritmo do número de estafilococos coagulase negativos incubados à 25, 30 e 37°C, segundo o tempo para leite (amostras tratadas e não tratadas termicamente).....	51
Tabela 11 – Valores descritivos do logaritmo do número de estafilococos coagulase negativos incubados à 25, 30 e 37°C, segundo o tempo para presunto (amostras tratadas e não tratadas termicamente).....	51
Tabela 12 – Valores descritivos do logaritmo do número de estafilococos coagulase negativos incubados à 25, 30 e 37°C, segundo o tempo para creme de confeitaria (amostras tratadas e não tratadas termicamente).....	52
Tabela 13 – Análise de variância multivariada com medidas repetidas do número de estafilococos para leite.....	62
Tabela 14 – Análise de variância multivariada com medidas repetidas do número de estafilococos para presunto cozido.....	62
Tabela 15 – Análise de variância multivariada com medidas repetidas do número de estafilococos para creme de confeitaria.....	63
Tabela 16 – Análise de variância a 3 vias do número de estafilococos para leite em cada tempo.....	64
Tabela 17 – Análise de variância a 3 vias do número de estafilococos para presunto cozido em cada tempo.....	65
Tabela 18 – Análise de variância a 3 vias do número de estafilococos para creme em cada tempo.....	66
Tabela 19 – Detecção de enterotoxinas estafilocócicas nos alimentos pelas linhagens testadas através do método ELFA.....	69

Tabela 20 – Detecção de enterotoxinas estafilocócicas nos alimentos pelas linhagens testadas através do método RPLA.....	71
--	----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 01 – Boxplot do logaritmo do número de estafilococos incubados a 25, 30 e 37°C segundo o tempo, para o leite tratado e não tratado termicamente.....	53
Gráfico 02 – Boxplot do logaritmo do número de estafilococos incubados a 25, 30 e 37°C segundo o tempo, para o presunto cozido tratado e não tratado termicamente.....	53
Gráfico 03 – Boxplot do logaritmo do número de estafilococos incubados a 25, 30 e 37°C segundo o tempo, para o creme de tratado e não tratado termicamente.....	54
Gráfico 04 – Boxplot do logaritmo do número de estafilococos segundo o tempo e a temperatura, para o leite tratado e não tratado termicamente.....	57
Gráfico 05 – Boxplot do logaritmo do número de estafilococos segundo o tempo e a fonte, para o leite tratado e não tratado termicamente.....	57
Gráfico 06 – Boxplot do logaritmo do número de estafilococos segundo o tempo e a temperatura, para o presunto tratado e não tratado termicamente.....	58
Gráfico 07 – Boxplot do logaritmo do número de estafilococos segundo o tempo e tipo de flora, para o presunto tratado e não tratado termicamente.....	58
Gráfico 08 – Boxplot do logaritmo do número de estafilococos segundo o tempo e a temperatura, para o creme tratado e não tratado termicamente.....	59

Gráfico 09 – Boxplot do logaritmo do número de estafilococos segundo o tempo e a fonte, para o creme tratado e não tratado termicamente.....59

RESUMO

Devido ao aumento crescente de surtos de intoxicação alimentar provocados pela contaminação de alimentos por diferentes microrganismos ou seus metabólitos, esta pesquisa foi realizada com o objetivo de investigar o comportamento e a produção de enterotoxinas, em alimentos, por estafilococos coagulase negativos. Há algum tempo, acreditava-se que somente *S.aureus* fosse capaz de produzir enterotoxinas em alimentos, mas pesquisas recentes demonstrando a capacidade enterotoxigênica em meios de cultura laboratorial, por linhagens de estafilococos coagulase negativas, instigaram a busca de comproboriedade com essa mesma capacidade em alimentos.

Assim, cinco linhagens de estafilococos coagulase negativas, de origem bovina, e cinco de origem humana, foram utilizadas para o estudo. Essas linhagens foram selecionadas por sua comprovada produção de enterotoxinas em meio de cultura. As linhagens teste então identificadas foram assim discriminadas: (2) *S.warneri*, (1) *S.hyicus*, (1) *S.chromogenes*, (3) *S.epidermidis*, (2) *S.xylosus*, (1) *S.hominis*. Leite em pó desnatado e presunto cozido adquiridos comercialmente e creme de confeitaria, preparado no laboratório, caracterizaram os alimentos selecionados para a experimentação, que se realizou a temperaturas diferenciadas de 25°C, 30°C e 37°C, seguindo tempos diferentes de incubação de 12, 24, 48 e 72 h. Concomitantemente, amostras previamente tratadas termicamente destes substratos, foram também estudadas, a fim de se apurar possível interferência da microbiota pré-existente.

O desenvolvimento das dez linhagens teste foi observado em todos os alimentos, com destaque para *S.chromogenes* (origem bovina), desenvolvendo-se muito bem em todas as amostras analisadas. A temperatura ótima de crescimento foi evidenciada a 37°C e o período de incubação de 12 a 24 horas, o melhor para o crescimento da população. Após esse tempo foi

verificada uma tendência a constância e, em alguns casos, ocorreu uma queda na contagem de microrganismos. Para presunto cozido houve um melhor desenvolvimento dos estafilococos, quando as amostras eram tratadas termicamente.

A análise estatística dos dados encontrados referentes ao desenvolvimento dos estafilococos coagulase negativos nos três alimentos estudados, indicou que o tempo de incubação foi significativo para todos os alimentos. Em uma segunda análise, a análise de variância a três vias em cada um dos tempos de coleta, onde as variáveis analisadas foram temperatura de incubação (25°C, 30°C e 37°C), fonte (origem bovina e origem humana), tipo (amostras tratadas e não tratadas termicamente), para as amostras de leite as interações temperatura x tempo; fonte x tempo e tipo x tempo foram significativas. Nas amostras de presunto houve significância nas interações temperatura x tempo e tipo x tempo e para as amostras de creme as interações fonte x tempo e tipo x tempo foram significativas ($p < 0,05$).

Da dez linhagens teste inoculadas, apenas *S.warneri* (01) e *S.chromogenes* (01), ambas de origem bovina, mostraram-se aptas a produzir enterotoxinas nos alimentos experimentalmente inoculados.

Este trabalho pode contribuir como subsídio para uma possível reavaliação dos procedimentos microbiológicos normativos da legislação sobre alimentos, que até o momento, correlacionam a produção da enzima coagulase com a capacidade de produção de enterotoxinas por estafilococos.

ABSTRACT

Due to the constantly increasing numbers of food poisoning outbreaks resulting from the contamination of food by different microorganisms or their metabolites, this research was realized with the objective of verifying the behavior and production of enterotoxins in food by coagulase negative strains of *Staphylococcus*.

For some time it was thought that only *S.aureus* was able to produce enterotoxins in food, but recent research has demonstrated the enterotoxigenic of coagulase negative staphylococcal strains in culture medium, leading to the need to check for such enterotoxigenic capacity in food.

Five coagulase negative bovine staphylococcal strains and five human ones were used for this study. These strains were chosen due to their prover ability to produce enterotoxins in culture medium. The test staphylococcal strains were identified as *S.warneri* (2), *S.hyicus* (1), *S.chromogenes* (1), *S.epidermidis* (3), *S.xylosus* (2) and *S.hominis* (1).

The foods chosen for the experiment were non-fat dried milk, cream pies and cooked ham. Sterilized and non-sterilized food samples were used in order to check for possible interference by pre-existent microorganism.in the food The research was conducted under different temperature/time incubation conditions of 25°C, 30°C and 37°C for 12, 24, 48 and 72 hours.

The development of the ten test strains was observed in all food samples, that of bovine *S. chromogenes*, being especially apparent. A statistical analysis showed that 37°C was the optimum temperature for growth and 12 – 24 hours the best incubation period, the microbial population tending to stabilize or

even decrease after this period. In the cooked ham samples, better staphylococcal growth was shown in the heat treated samples.

The statistical analysis of the data for growth showed that incubation time was significant for all foods. A second analysis of variance at each incubation time, where the variables were incubation time (25°C, 30°C and 37°C), source (bovine and human) and type (heat treated and non-heat treated), showed that for the milk samples, the interactions temperature x time, source x time and type x time were all significant. For the ham samples the interactions temperature x time and type x time were significant and for the cream pies the interactions source x time and type x time (all at $p < 0.05$).

Of the ten strains tested, only bovine *S.warneri* and *S.chromogenes* strains were capable of producing enterotoxins in the foods analyzed.

The results of this study indicate that research emphasising the importance of coagulase negative staphylococci in food poisoning outbreaks is important, leading to a possible reevaluation of the legislation regarding microbiological procedures which previously correlated the production of the enzyme coagulase with the production of enterotoxins.

1 - INTRODUÇÃO

O papel etiológico dos estafilococos, sobretudo *S.aureus*, em patologias humanas e animais, bem como a produção de suas enterotoxinas, responsáveis por surtos de intoxicação alimentar, remonta ao século passado, e dispõe de ampla divulgação científica.

No Brasil, dados do Ministério da Saúde indicam que cerca de 21.000 pessoas foram internadas no ano de 1987 devido a algum tipo de intoxicação alimentar, sendo que destas, 4.500 internações foram observadas em crianças menores que cinco anos. Os agentes etiológicos de maior ocorrência foram *S.aureus* e *C.perfringens*, envolvidos em 50% dos surtos investigados (GERMANO et al., 1993).

Dos alimentos mais frequentemente envolvidos em surtos por intoxicação estafilocócica, são destacados os produtos lácteos (queijo; leite cru; pausteurizado e em pó; manteiga e sorvetes), produtos de confeitaria (tortas, bolos recheados e doces cremosos), carnes frescas e curadas, ovos e massas alimentícias, frutas, vegetais e saladas. Os maiores disseminadores do microrganismo aos alimentos são os manipuladores, que, na maioria das vezes, não são treinados, de forma adequada, em técnicas de assepsia, destacando-se então como os principais responsáveis pela ocorrência de surtos.

Normalmente, o controle feito pelas indústrias de alimentos e órgãos de fiscalização adota a metodologia recomendada pelo FDA (Food and Drug Administration) e APHA (American Public Health Association), onde as provas de

produção de coagulase e desoxirribonuclease termorresistente após, o isolamento do microrganismo nos alimentos, caracterizam o procedimento padrão.

Apesar de alguns autores (CRASS & BERGDOLL, 1986; FUKUDA et al., 1984; OLIVEIRA & PEREIRA, 1995) terem observado a produção de enterotoxinas por espécies coagulase negativas, a produção de coagulase, como indicativo da patogenicidade e enterotoxigenicidade de estafilococos, ainda é amplamente aceita. BRECKINRIDGE and BERGDOLL (1971) relataram uma intoxicação, provocando gastroenterite aguda, em razão da existência de enterotoxinas no alimento, produzidas por linhagens de *Staphylococcus epidermidis*. Posteriormente, em 1986, um outro surto aconteceu como decorrência da produção de enterotoxina A por uma linhagem coagulase negativa isolada de frangos (CRASS & BERGDOLL, 1986)..

GARCIA et al. (1986) determinaram a ocorrência de estafilococos em fossas nasais de manipuladores de alimentos; embora os autores tenham encontrado como predominantes as espécies *S.aureus* e *S.epidermidis*, observaram também, a incidência de *S.capitis*, *S.hominis*, *S.haemolyticus*, *S.saprophyticus* e *S.chromogenes*.

Estafilococos coagulase negativos também são encontrados na superfície do corpo de animais lactantes, podendo ser responsáveis por episódios de mastites e, conseqüentemente, pela contaminação do leite.

Até o momento, não há divulgação de estudos que tratem do comportamento de espécies coagulase negativas produtoras de enterotoxinas em alimentos. As informações existentes apenas relatam a existência de tais

cepas, comprovando sua enterotoxigenicidade pela detecção de enterotoxinas produzidas em meios de cultura utilizados em laboratórios de análise microbiológica.

Tendo ciência que espécies coagulase negativas fazem parte da microbiota normal de humanos e animais, e ainda pelo fato de serem capazes de produzir enterotoxinas e causar surtos de intoxicação alimentar, torna-se imprescindível o seu estudo para que seja esclarecida sua verdadeira importância em microbiologia de alimentos, bem como os riscos que possam representar à saúde da população, em especial àquela submetida à refeições coletivas.

1.1 -OBJETIVO GERAL

As metas buscadas com o desenvolvimento deste trabalho serão:

- 1- Identificar dez linhagens de estafilococos enterotoxigênicos coagulase negativos previamente isolados a partir de leite bovino e de manipuladores de alimentos.
- 2- Verificar a capacidade de crescimento e produção de enterotoxinas das 10 linhagens de estafilococos coagulase negativas identificadas, de origem bovina e humana, em leite em pó desnatado, presunto cozido e creme de confeitaria, experimentalmente inoculados.
- 3- Em se constatando a produção de enterotoxinas nos alimentos pelas cepas coagulase negativas, investigar o seu comportamento em diferentes condições de tempo, temperatura e substrato, objetivando fornecer informações a respeito destas linhagens.
- 4- Comparar as espécies isoladas de leite bovino às aquelas isoladas de manipuladores de alimentos, quanto ao seu desenvolvimento e produção de enterotoxinas nos diferentes alimentos estudados e nas diferentes condições de tempo e temperatura.
- 5- Verificar o efeito antagonista da microbiota natural dos alimentos sobre o crescimento das linhagens em estudo.

1.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Identificar, segundo critérios bioquímicos e morfotintoriais, dez linhagens de estafilococos coagulase negativas previamente isoladas de leite bovino e de manipuladores de alimentos.
- 2- Avaliar o crescimento e produção de enterotoxinas das dez linhagens de estafilococos coagulase negativas em diferentes alimentos e condições de tempo e temperatura de incubação, correlacionando origem bovina e origem humana.
- 3- Verificar o efeito antagonista da microbiota contaminante presente nos alimentos sobre o crescimento das linhagens em estudo.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Taxonomia

Um total de 28 espécies e oito sub-espécies já foram reconhecidas no gênero *Staphylococcus*, conforme apresentado na 9ª edição do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (HOLT et al., 1994). Desde então, novas espécies e sub-espécies estão sendo descritas, dentre elas: *S.muscae* (HÁJEK et al., 1992), *S.pasteuri* (CHESNEAU et al., 1993), *S.piscifermentans* (TANASUPAWAT et al., 1992), *S.pulvereri* (ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA et al., 1995), *S.vitulus* (WEBSTER et al, 1994) e mais recentemente *S.saprophyticus* subsp. *bovis* (HÁJEK et al., 1996) e *S.succinus* (LAMBERT et al., 1998).

São capazes de coagular o plasma de coelho as espécies *S.aureus* subsp. *aureus*; *S.aureus* subsp. *anaerobius*; *S.delphini*; *S.intermedius*; *S.schleiferi* subsp. *coagulans* e *S.hyicus*, para esta última 11-89% podem ser consideradas positivas (HOLT et al, 1994).

A produção de desoxirribonuclease termorresistente é uma característica de *S.aureus* subsp. *aureus*; *S.aureus* subsp. *anaerobius*; *S.intermedius*; *S.hyicus*; *S.schleiferi* subsp. *coagulans*; *S.scheleiferi* subsp. *schleiferi*; *S.carnosus*, que apresenta uma reação retardada, *S.epidermidis*; *S.simulans*; *S.chromogenes* e *S.felis* podem ou não serem produtoras (HOLT et al., 1994).

2.2 – Características dos Estafilococos

Os estafilococos são microrganismos Gram positivos, anaeróbios facultativos, catalase positivos, com exceção de *S.aureus* subsp. *anaerobius*, não possuem motilidade, não são fotossintéticos e nem formadores de esporos (MINOR & MARTH, 1972; KLOOS, 1980). São mesófilos que crescem melhor em condições aeróbias. A temperatura ótima de crescimento é de 37°C, mas algumas linhagens podem crescer no intervalo de 39 a 40°C (PEREIRA & SALZBERG, 1982), sendo que à 10°C ainda é possível verificar o crescimento. Muitas linhagens produzem pigmentos amarelos ou alaranjados, particularmente em meio contendo cloreto de sódio, e fermentam uma variedade de carboidratos produzindo ácido láctico com ausência de gases (MINOR & MARTH, 1972).

O pH ótimo para o crescimento de *S.aureus* está no intervalo entre 6,0 a 7,0, podendo crescer numa faixa entre 4,0 a 9,8; foi observado também, que *S.aureus* cresce em concentrações de até 20 % de cloreto de sódio (TATINI, 1973).

S.aureus possui a habilidade de tolerar baixa atividade de água (Aa). A Aa ótima para o seu crescimento é maior que 0,99, mas pode também crescer numa faixa de 0,99 a 0,83 (TATINI, 1973). Segundo SCOTT (1953), *S.aureus* é capaz de se desenvolver aerobicamente em meio de cultura com uma Aa de 0,86, mas seu crescimento é inibido quando a Aa está abaixo de 0,91 em condições anaeróbias.

Embora muitos testes tenham sido desenvolvidos para o isolamento e identificação dos estafilococos, somente alguns são utilizados na rotina de um laboratório de análises microbiológicas de alimentos. Dentre estes, estão a produção da enzima coagulase, de nuclease termoestável (TNase) e sensibilidade a lisostafina. Utilização anaeróbia de glicose e manitol também podem ser utilizadas. Outras considerações importantes na identificação dos estafilococos incluem a observação direta em microscópio e atividade de catalase (BENNETT et al., 1986).

A enzima coagulase produzida pelos estafilococos, possui a capacidade de coagular o plasma humano e de outros animais, por ativação da protrombina que resulta na conversão do fibrinogênio em fibrina (FOSTER & Mc DEVITT, 1994). A nuclease termoestável (TNase) por sua vez, é uma fosfodiesterase que possui a capacidade de clivar tanto o DNA como o RNA (NISKANEM & KOIRANEN, 1977). Esta enzima é produzida por 99% de *S.aureus* (PARK et al., 1980).

Um outro produto específico de *S.aureus* é a proteína A (FORSGREN, 1970). A proteína A é um constituinte da parede celular de *S.aureus*, e está ligada covalentemente a estrutura do peptideoglicano. CHANG and HUANG (1994) mencionam que esta proteína, raramente é utilizada com o propósito de identificação de *S.aureus*, talvez pela sua natureza não enzimática, torne o ensaio para sua detecção, mais difícil que o ensaio das enzimas coagulase e TNase.

2.3 – Enterotoxinas Estafilocócicas

Alguns estafilococos possuem a capacidade de produzir enterotoxinas, quando inoculados em meio de cultura laboratorial e, também, em vários alimentos. As enterotoxinas, quando ingeridas pelo homem, podem provocar uma síndrome gastroentérica (BERGDOLL, 1972).

Até o momento, nove tipos de enterotoxinas imunologicamente distintas foram identificadas, a saber: enterotoxina estafilocócica A (EEA) por CASMAN et al., 1960; EEB (BERGDOLL et al, 1959); EEC₁ (CASMAN et al., 1967); EEC₂ (AVENA & BERGDOLL, 1967); EEC₃ (REISER et al., 1984); EED (CASMAN et al., 1967); EEE (BERGDOLL et al., 1971); EEG, ainda não purificada (BETLEY et al, 1992); EEH (SU & WONG, 1995) e "TSTS"-1, esta última associada à síndrome do choque tóxico (SCHLIEVERT et al., 1981) e, atualmente, não considerada como uma enterotoxina.

A identificação das enterotoxinas vem sendo feita com base em suas reações com anticorpos específicos (CASMAN et al., 1963) e, no caso das enterotoxinas do grupo C, estas reagem com o mesmo anticorpo principal; porém reagem também com anticorpos específicos, permitindo assim, sua identificação e isolamento, através destes últimos, o que indica que as estruturas individuais das enterotoxinas C diferem, tanto em perfil imunológico quanto eletroforético (LEE et al., 1980).

As toxinas purificadas são moléculas proteicas, cujo peso molecular varia de 27,5 a 20 KD. São formadas por uma cadeia simples de polipeptídeos,

com estrutura básica similar, todas portanto, possuem pontes de dissulfeto presentes no centro da molécula (TRANTER, 1990).

As enterotoxinas estafilocócicas são moléculas termoestáveis, resistem a uma temperatura de 121°C por 3 a 8 minutos, não sendo inativadas pela temperatura utilizada no processamento dos alimentos, embora o microrganismo seja facilmente destruído, D60°C = 0,43 a 8 minutos (BAIRD-PARKER, 1990). O valor "z" para a enterotoxina B (52 – 58°F) é maior que para a enterotoxina A (46 – 50°F), indicando uma maior resistência da enterotoxina B (READ, 1966). A inativação das enterotoxinas não depende somente da temperatura, mas também da composição e pH do meio que as contêm (TATINI, 1976).

Alguns estudos indicam que a perda da atividade imunológica é maior entre 70 a 80°C do que entre 90 a 100°C (TRANTER, 1990). TATINI (1976) relata que existe um aumento na atividade biológica das enterotoxinas, após tratamento térmico. SCHWABE et al. (1990) demonstraram que a enterotoxina, após ter sido completamente inativada por tratamento térmico, pode recuperar sua atividade biológica e imunológica, seguindo um ajuste de pH igual a 11,0 e posterior redução até pH 7,0.

Teoricamente, uma simples célula de *S.aureus* pode ser capaz de iniciar crescimento e produzir enterotoxinas em alimentos, se as condições forem adequadas ao microrganismo. Entretanto, para *S.aureus* crescer e multiplicar nestes substratos, deverá ser capaz de competir com a microbiota pré-existente (GOEPFERT and KIM, 1975).

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

TATINI (1973) observou que a produção de enterotoxinas por *S.aureus* pode ocorrer numa faixa de 10 a 46°C, sendo a temperatura ótima de 40 a 45°C. Com relação ao pH, BARBER and DEIBEL (1972) demonstraram que valores baixos de pH favorecem a síntese de enterotoxinas A, B, C₂ e E, quando as culturas foram incubadas em aerobiose em meio BHI (Brain Heart Infusion) a pH 4,9; 5,0; 4,9 e 4,8, respectivamente. Em anaerobiose, o pH mínimo para a produção das enterotoxinas A, B, C₂ foi 5,7; enquanto que o mínimo para a enterotoxina E foi 5,0. Os autores observaram também em outras linhagens que a produção de enterotoxina A ocorreu na faixa de pH entre 4,9 a 5,7, em aerobiose, e 5,7 a 7,0, em anaerobiose.

O requerimento de Aa para a produção de enterotoxinas é similar àquele para o crescimento de *S.aureus*, com uma variação de 0,86 a > 0,99 e um ótimo acima de 0,99. Quando parâmetros nutricionais e ambientais são otimizados, o crescimento de estafilococos pode aumentar, mesmo havendo a redução de Aa. Quando estes parâmetros afastam-se do ótimo, a Aa mínima tolerada por *S.aureus* eleva-se (SMITH et al, 1983).

2.4 – Mecanismo de Ação das Enterotoxinas

Quanto ao quadro clínico apresentado por indivíduos que tenham ingerido enterotoxinas estafilocócicas, verificou-se que este é caracterizado por vômitos incoercíveis, diarreia e mal estar; após um período médio de incubação entre 4 a 6 horas. O quadro pode ser agravado, quando indivíduos muito jovens, idosos ou pessoas fisiologicamente debilitadas são expostas a ação destas toxinas. Os sintomas desaparecem rapidamente em 24 horas (BERGDOLL, 1983).

O estudo de um surto de intoxicação alimentar ocorrido em Madison, Wisconsin, EUA, envolvendo uma população de estudantes de segundo grau, onde o alimento envolvido no surto foi leite achocolatado, possibilitou concluir que 200 ng ou menos de enterotoxina A pôde provocar intoxicação em indivíduos sensíveis (EVENSON et al., 1988).

A resposta emética ocorre por estímulos de receptores eméticos localizados no intestino e transmitidos ao cérebro via vago e nervos simpáticos. Após a realização de ensaios em animais submetidos a vagotomia e simpatectomia, observou-se não haver resposta à ação das enterotoxinas (TRANter, 1990).

O mecanismo de diarreia pode ser atribuído à inibição da absorção da água ou aumento do fluxo do líquido transmucoso no lúmen intestinal (BERGDOLL, 1979). Estudos feitos em ratos demonstraram que a enterotoxina

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

O conhecimento sobre como a estrutura das enterotoxinas está relacionada a sua atividade emética, ainda é muito restrito (HARRIS et al., 1995). Alguns autores têm sugerido que a toxicidade destas enterotoxinas está relacionada a grande quantidade de citocina liberada, seguida pela ativação das células T linfocitárias (MARRACK and KAPPLER, 1990).

Outros estudos sugerem que a atividade emética e o seu papel como “superantígenos” não estão correlacionados. Carboximetilação dos resíduos de histidina da EEA e EEB pode anular a atividade, quando administrada intragastricamente em animais de laboratório (IKEJIMA et al., 1988).

HARRIS et al. (1995) estudando, a partir de mutantes, a importância de certos resíduos e aminoácidos N terminais da enterotoxina estafilocócica A, quanto a atividade biológica, observaram que Asn-25, Phe-47 e Leu-48 são importantes para a atividade emética e atividade de “superantígenos” (que é a estimulação de todas células T). Mutantes produtores de EEA, com substituições na posição 25, 47 ou 48, tiveram diminuição na atividade estimulatória das células T. Com relação a atividade emética, em macaco *rhesus*, os mutantes à posição 25 ou 48, exibiram diminuição, mas com uma significativa atividade.

2. 5- Detecção de Enterotoxinas

Como já citado anteriormente, as enterotoxinas são completamente estáveis a fatores físicos e químicos, podendo estar presentes nos alimentos mesmo quando não mais da presença do agente etiológico. Assim, métodos de detecção de enterotoxinas estão em constante desenvolvimento e os métodos biológicos e sorológicos na averiguação das mesmas são os mais usuais.

Os métodos biológicos consistem na administração intraperitoneal ou intravenosa de soluções com concentrações variáveis de enterotoxinas em gatos e administração oral em macacos rhesus (VARADAJ & RANGANATHAN, 1989). O método mais eficaz para o diagnóstico de enterotoxinas é o ensaio biológico, utilizando macaco *rhesus* (*Macaca mulatta*), porque entre os diferentes metabólitos produzidos por estafilococos, somente as enterotoxinas são capazes de provocar reação emética em macacos, o mesmo sintoma apresentado em humanos, após a ingestão de alimentos com as enterotoxinas estafilocócicas presentes (SURGALLA et al., 1953). No entanto, dificuldades e custos inerentes a ensaios utilizando animais, torna inviável o seu uso, dando lugar a ensaios mais rápidos, econômicos e de fácil execução.

Os ensaios imunológicos têm sido desenvolvidos com especificidade e sensibilidade diferentes. Os métodos mais frequentemente utilizados para a detecção das enterotoxinas são imunodifusão, imunoaglutinação, radioimunoensaio e a técnica de ensaio imunoenzimático (EIA). A imunodifusão não requer a necessidade de um equipamento especial, mas consome um longo tempo para a obtenção dos resultados e é pouco sensível. A técnica de

imunoaglutinação é sensível, mas inviável para a análise de um grande número de amostras de alimentos, devido aos problemas de aparecimento de reações inespecíficas. O radioimunoensaio é uma técnica rápida e sensível, mas requer o uso de material radioativo. Entre os vários métodos de detecção de enterotoxinas, um dos mais promissores é a técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Este método é rápido, sensível e não há necessidade de material radioativo (ORDEN, et., 1992).

No que tange às técnicas voltadas à biologia molecular, o progresso na tecnologia de DNA recombinante parece oferecer possibilidades para o desenvolvimento de novos ensaios analíticos para a detecção de microrganismos responsáveis pela contaminação dos alimentos (TRANTER and BREHM, 1990; SNOPOKOVÁ et al., 1994; GOH et al., 1997).

Em 1992, JAULHAC et al., desenvolveram um ensaio genotípico, baseado na hibridização com sonda de oligonucleotídeos, para a detecção específica do gene responsável pela produção da toxina da síndrome do choque tóxico e dos genes responsáveis pela produção das enterotoxinas estafilocócicas A, B, C, D e E. Para cada gene da toxina, uma sequência de nucleotídeos foi previamente determinada. Um total de 143 linhagens de estafilococos, 133 *S.aureus* e 12 espécies coagulase negativas, foram estudadas através deste ensaio genotípico e por ensaios fenotípicos (imunodifusão em gel e ELISA). Os autores encontraram uma ótima correlação entre os ensaios testados. E concluíram que o ensaio genotípico é conveniente para estudos epidemiológicos. Quanto à investigação de enterotoxinas em alimentos envolvidos em intoxicações, os ensaios fenotípicos, como os métodos imunológicos, são mais úteis, pois detectam diretamente as enterotoxinas nos alimentos.

2.6 – Relatos Epidemiológicos

São consideráveis os dados na literatura referentes à incidência de *S.aureus* enterotoxigênicos isolados a partir de animais, alimentos e portadores humanos (CASMAN et al., 1967; WIENEKE, 1974; OLSON et al., 1970; NISKANEM & KOIRANEN, 1977; KLOOS, 1980; OLSVIK et al., 1981; GUTIERREZ et al., 1982; HARVEY & GILMOUR, 1985; POLLEDO et al., 1985; DE BUYSER et al., 1987; HARVEY & GILMOUR, 1988; RADDI et al., 1988; UMOH, 1988; EL-DAIROUTY, 1989; HARDT-ENGLISH et al., 1990; NANU and NARAYAN, 1992; MARIN et al., 1992; NG and TAY, 1993).

No Brasil, foram relatados alguns surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, sendo incriminados, principalmente bolos confeitados, queijo “tipo Minas”, nhoque e sorvete (SABIONI et al., 1988; CARMO et al., 1990; PEREIRA et al., 1991; CERQUEIRA-CAMPOS et al., 1993)

EL- DAIROUTY (1989) relatou uma série de surtos de intoxicação ocorridos no EGITO, no ano de 1986, devido ao consumo de leite em pó desnatado importado.

Vários surtos de intoxicação estafilocócica ocorreram nos Estados Unidos, em 1989, como resultado do consumo de cogumelos enlatados importados da China (HARDT-ENGLISH et al., 1990; BRUNNER and WONG, 1992) e, em 1986, foi divulgado também, um surto de gastroenterite ocorrido na Califórnia. Para este, os sintomas decorrentes da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas A e C presentes em macarrão “tortellini” consumido durante uma

refeição oferecida aos participantes de uma conferência Literária (BRYANT et al., 1988).

2.7 – Produção de Enterotoxinas Por Outras Espécies de Estafilococos

Das 32 espécies de *Staphylococcus* citadas na literatura, *S.aureus* sempre foi considerado aquele de grande importância por sua capacidade enterotoxigênica, mas tal capacidade já não é mais exclusiva dessa espécie, uma vez que existem relatos de que outras espécies de estafilococos também possuem tal capacidade.

OLSVIK et al. (1982) demonstraram a produção de uma ou mais enterotoxinas A, B ou C por espécies coagulase negativas classificadas como *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.capitis* e ainda, *Micrococcus luteus*.

ADESIYUN et al. (1984) verificaram ausência, utilizando testes sorológicos, de produção de enterotoxinas por linhagens de *S.hyicus*. Entretanto, todas as linhagens produziram resposta emética em dois ou mais macacos utilizados para o ensaio biológico.

FUKUDA et al. (1984) constataram que 24% das 210 linhagens de *S.intermedius* isolados de cães produziram uma ou mais enterotoxina A, B ou C.

CRASS & BERGDOLL (1986) relataram a produção de enterotoxinas A e C por linhagens de estafilococos não produtores de coagulase e

desoxirribonuclease termorresistente e por *S.epidermidis*. Os autores também descreveram uma linhagem coagulase negativa isolada de frangos responsável por um surto de intoxicação alimentar devido a produção de enterotoxina A.

HARVEY & GILMOUR (1990) ao examinar 37 amostras de leite em pó procedentes de cinco diferentes centros de processamento na Irlanda do Norte, encontraram nove diferentes espécies de estafilococos. Os isolados foram identificados como *S.epidermidis*, *S.hominis*, *S.warneri*, *S.haemolyticus*, *S.sciuri*, *S.capitis*, *S.cohnii*, *S.saprophyticus* e *S.xylosus*. Algumas amostras de leite em pó foram submetidas à análise de detecção de enterotoxinas utilizando o teste de aglutinação reversa passiva em látex, não sendo confirmada, contudo, a presença de EEA, EEB, EEC, nem EED.

A habilidade de 342 cepas de estafilococos isolados de diferentes sítios anatômicos de cabras saudáveis foi investigado por VALLE et al. (1990) que verificaram a produção de enterotoxina por 74,3% das 70 cepas coagulase positivas e por 22% das cepas coagulase negativas. Os autores observaram ainda, que as seguintes espécies foram produtoras de enterotoxinas: *S.aureus*, *S.hyicus*, *S..chromogenes*, *S.haemolyticus*, *S.warneri*, *S.epidermidis*, *S caprae*, *S.xylosus*, *S.sciuri*, *S.saprophyticus* e *S.lentus*, sendo detectado, no leite de 17 das 133 cabras saudáveis, as enterotoxinas A, B e C, pela técnica ELISA.

BAUTISTA et al. (1988) isolaram de leite de cabras, 124 linhagens de estafilococos e observaram a enterotoxigenicidade em 78 cepas, dentre estas, incluindo as espécies *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. xylosus*, havendo a produção das enterotoxinas A, B, C ou D.

OLIVEIRA & PEREIRA (1995) ao estudarem a incidência de cepas de estafilococos produtores usuais e baixo produtores de enterotoxinas isoladas de leite bovino, verificaram que das cepas isoladas, 73,7% mostraram-se enterotoxigênicas. Do total de cepas enterotoxigênicas, 19,4% eram coagulase negativas. VERNOSKY-ROZAND et al. (1996) observaram a produção de enterotoxinas por 10, dos 187 estafilococos coagulase negativos isolados de leite e queijo de cabras, a quantidade de enterotoxina detectada variou de 10 a 90 ng/mL do sobrenadante de cultura. As espécies produtoras de enterotoxinas foram identificadas como *S.simulans*, *S.xylosum*, *S.equorum*, *S.lentus* e *S.capitis*.

2.8 – Estafilococos em Alimentos

Alimentos dos mais variados são incriminados quanto a presença de estafilococos, sendo o leite e seus derivados os mais contaminados. Muitas das espécies de estafilococos conhecidas têm sido isoladas de leite cru de bovinos, caprinos e ovinos. *S.aureus*, *S.hominis*, *S.warneri*, *S.haemolyticus*, *S.xylosum*, *S.lentus*, *S.epidermidis*, *S.chromogenes*, *S.hyicus*, *S.sciuri*, *S.simulans*, *S.capitis*, *S.auricularis*, *S.saprophyticus* já foram isolados do leite desses animais (HARVEY & GILMOUR, 1985; de BUYSER et al., 1987, BAUTISTA et al., 1987; GARCIA et al., 1988; BURRIEL, 1998).

Leite em pó também já foi incriminado em surtos de intoxicação pela presença de enterotoxinas e de células de *S.aureus* (GALESLOOT & STACHOUDERS, 1968; EL-DAIROUTY, 1988). HARVEY and GILMOUR (1990)

isolaram e identificaram estafilococos existentes em leite em pó produzido na Irlanda do Norte. Dentre as espécies presentes, encontraram *S.capitis*, *S.saprophyticus* e *S.choinii*, estas informações demonstram que, mesmo em alimentos processados, pode haver a presença do microrganismo.

A presença de estafilococos em queijo e o seu envolvimento em surtos de intoxicações foi relatado por Sabioni et al (1988). A capacidade de *S.aureus* sobreviver, crescer e produzir enterotoxinas em queijos tem também sido estudada (GOMEZ-LUCIA et al., 1992; MEYRAND et al, 1998).

Outros alimentos onde foram constatados o crescimento e produção de enterotoxinas por *S.aureus* foram: cremes (HALPIN-DOHNALEK and MARTH, 1989; HIROOKA et al., 1987); manteiga (HALPIN-DOHNALEK and MARTH, 1989); cogumelos (*Agaricus bisporus*) (BRUNNER and WONG, 1992; MARTIN and BEELMAN, 1995); leguminosas, como feijão e soja (NEUMAYR and KRAMER, 1989); leite fermentado (UMOH and GOMWALK, 1987); massas do tipo "talharin" (GÖCKLER et al., 1988), salmão e sardinhas enlatadas (STERSKY et al., 1984); bebidas (NG and TAY, 1992); e presunto (MARIN et al., 1992). Nas amostras de presunto, além de *S.aureus*, os pesquisadores encontraram duas linhagens de *S.epidermidis* produtoras de enterotoxina C.

2.9 – Estafilococos em Portadores Humanos

Como *S.aureus*, estafilococos coagulase negativos fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas de animais e humanos (GASZEWSKA-MARTALARZ et al., 1995).

GARCIA et al. (1986) isolaram 201 cepas das fossas nasais de 300 manipuladores de alimentos, a maioria das cepas de estafilococos isolados foram classificados como *S.epidermidis* (97 cepas) e *S.aureus* (81 cepas). Observaram ainda que tais linhagens estavam presentes em grande número nas fossas nasais (10^3 e acima de 10^5 UFC). *S.epidermidis* predominou quando *S.aureus* estava ausente ou em baixo número. Embora essas duas espécies tenham sido as predominantes, verificaram também a incidência de *S.capitis*, *S.hominis*, *S.haemolyticus*, *S.saprophyticus* e *S.hyicus* subsp. *chromogenes*.

Espécies coagulase negativas são contaminantes comuns em hospitais. *S.saprophyticus* e *S.epidermidis* são os mais importantes na área clínica, podendo causar bacteremia (HOVELIUS and MARCH, 1984; GOLLEDGE, 1988).

2.10 – Estafilococos em Animais

Em animais, as espécies mais frequentemente encontradas são:

em bovinos - *S.lentus*, *S.xylosus*, *S.cohnii*, *S.chromogenes*, *S.hyicus*, *S.simulans*, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.warneri* e *S.aureus* (DEVRIESE et al., 1985).

em suínos - *S.lentus*, *S.xylosus*, *S.sciuri*, *S.hyicus*, *S.chromogenes*, *S.aureus*, *S.simulans* e *S.hominis* (DEVRIESE et al., 1985 and SHIMIZU et al., 1987).

em ovinos - *S.lentus* e *S.sciuri* (DEVRIESE et al., 1985)

em caprinos - *S.lentus*, *S.sciuri*, *S.xylosus* (DEVRIESE et al., 1985)

em equinos - *S.equorum*, *S.sciuri*, *S.xylosus*, *S.aureus* e *S.intermedius* (DEVRIESE et al., 1984).

em aves - *S.lentus*, *S.xylosus*, *S.sciuri*, *S.cohnii*, *S.gallinarum*, *S.hyicus*, *S.aureus*, *S.chromogenes* (DEVRIESE et al., 1985).

Estudos realizados por FREITAS e MAGALHÃES (1990) demonstraram que *S.aureus* é um dos maiores causadores de mastite bovina, com elevado índice de infecção no rebanho leiteiro bovino. No entanto, nos últimos anos foram encontradas evidências de que outras espécies de estafilococos (*S.hyicus*, *S.epidermidis*, *S.warneri*, *S.chromogenes*, *S.simulans*) responsabilizam-se pela mastite sub-clínica e, ainda, por doenças de pele nos animais leiteiros (GILMOUR & HARVEY, 1990). Estes microrganismos podem contaminar o leite e, como potencialmente possuem capacidade enterotoxigênica, podem virem a ser responsáveis por surtos de intoxicações.

As informações apresentadas demonstram a grande importância dos estafilococos; importância esta não restrita a *S.aureus*, mas extensiva a outras

espécies não produtoras da enzima coagulase, estando igualmente envolvidas em surtos de intoxicações alimentares, como já relatado por BRECKINRIDGE and BERGDOLL (1971) e CRASS and BERGDOLL (1986).

Há portanto, a necessidade de estudos mais aprofundados na elucidação do seu comportamento em alimentos, quanto a produção de enterotoxinas.

3 - MATERIAL E MÉTODO

3.1 - Material

3.1.1 – Linhagens de Estafilococos Coagulase Negativas Estudadas

Foram utilizadas dez linhagens de estafilococos enterotoxigênicos coagulase negativos, cinco de origem bovina e cinco de origem humana. As linhagens de origem bovina foram isoladas a partir de leite bovino cru, e as de origem humana isoladas de mãos e fossas nasais de manipuladores de alimentos. As linhagens foram escolhidas ao acaso.

3.1.2 - Alimentos Empregados para o Estudo

Os seguintes alimentos foram empregados para a averiguação da produção de enterotoxinas pelas cepas em estudo:

- leite em pó desnatado e presunto cozido, adquiridos em supermercados da região de Campinas, SP.
- creme de ovos preparado no próprio laboratório, utilizando-se o mesmo método e ingredientes empregados em estabelecimentos comerciais.

3.1.3 – Meios de Cultivo Laboratorial e Reagentes

- Bacto Baird-Parker Agar Base, Difco, adicionado de telurito de potássio e gema de ovo
- Plate Count Agar (PCA), Difco
- Meio de cultura, para a produção de enterotoxinas - triptona (Difco)3% e extrato de levedura (Biobrás)1%.
- Complexo agar-DNA-Azul de toluidina
- Plasma liofilizado de coelho, Difco
- Sistema Api Staph, bio Mérieux SA
- Mc Farland Standard, bio Mérieux SA
- Kit Vidas Staph Enterotoxin, bio Mérieux SA
- Kit RPLA ou SET-RPLA, manufaturado por Denka Seiken Co.Ltda, comercializado pela Oxoid

3.1.4 – Equipamentos

- ph-metro B 374, Micronal
- Centrífuga refrigerada RC5 C , Sorval Instruments
- mini Vidas , bio Mérieux
- Estufa C. B retilínea, Fanen Ltda.
- Câmara de fluxo laminar vertical, Veco
- Autoclave, mod 104 – Fabbe Ltda.

3.2 - Método

3.2.1 – Confirmação da Produção de Enterotoxinas pelas Linhagens Coagulase Negativas, em Condições de Cultivo Laboratorial

Para a confirmação da enterotoxigenicidade das dez linhagens escolhidas para o experimento, estas foram submetidas à produção de enterotoxinas em meio de cultura laboratorial. O método utilizado para a produção de enterotoxinas estafilocócicas foi o de cultura em papel celofane sobre o meio de 3% de triptona, 1% extrato de levedura e 1,5% de ágar bacteriológico em pH 7,0 (Robins et al., 1974), e incubação a 37°C por 24 horas. Após o crescimento do microrganismo, a superfície do papel foi lavada com 2,5 mL de tampão fosfato 0,01M.

A detecção de enterotoxinas do tipo A, B, C e D foram verificadas nos sobrenadantes de cultura, após centrifugação dos extratos a 900g por 20 minutos a 4°C, sendo utilizado o ensaio de Aglutinação Reversa Passiva em Látex (RPLA), de acordo com FUJIKAWA and IGARASHI (1988).

3.2.2 - Identificação das Linhagens de Estafilococos Coagulase Negativas, em Estudo

As dez linhagens, escolhidas ao acaso, previamente comprovadas quanto a produção de enterotoxinas, em meios de cultivo laboratorial, foram identificadas de acordo com os critérios descritos no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (KOOLS & SCHEIFER, 1986). Os seguintes testes foram realizados:

- Crescimento em meio Baird-Parker acrescido de gema de ovo e telurito de potássio; coloração de Gram; produção de catalase; produção de coagulase livre; produção de nuclease; produção de termonuclease.
- Testes complementares foram realizados utilizando o sistema de identificação para o gênero *Staphylococcus* e *Micrococcus*, API STAPH-IDENT (Bio-Mérieux Vitek), o qual inclui testes bioquímicos padronizados em miniaturas e uma base de dados específica.

3.2.3 - Estudo do Comportamento de Linhagens de Estafilococos Coagulase Negativas, em Alimentos Experimentalmente Inoculados

Os alimentos escolhidos para o experimento foram:

- **Leite em Pó Desnatado**

O leite foi obtido em supermercados da região de Campinas, SP. Após reconstituição com água destilada estéril, seguindo proporções estipuladas no rótulo do produtor; em frascos Erlenmeyer, amostras de 200 mL, não tratadas e termicamente tratadas em autoclave por 15min a 121°C, foram inoculadas com aproximadamente 10^3 UFC/mL, isoladamente, para cada linhagem a ser testada. Foi observado o crescimento e produção de enterotoxinas a partir de 12, 24 48 e 72h de incubação nas temperaturas de 25°C, 30°C e 37°C.

A densidade populacional foi estabelecida utilizando-se a Tabela de McFarland, cuja leitura de absorvância a 550 nm corresponde a densidade ótica

do padrão utilizado, e contagem de células, a partir de diluições seriadas em “PCA” (Plate Count Agar).

• Presunto Cozido

O presunto, também foi obtido em supermercados da região de Campinas, SP. Amostras de 100g foram distribuídas em placas de Petri. As placas foram divididas em dois lotes, um autoclavado e o outro utilizado diretamente, conforme anteriormente descrito para leite em pó. Inóculo, tempo e temperaturas de incubação seguiram os mesmos procedimentos utilizados para leite em pó.

• Creme de Confeitaria

O creme foi preparado utilizando-se o mesmo método e ingredientes empregados em estabelecimentos comerciais, nas seguintes quantidades:

100g de açúcar refinado, 100g de amido de milho, 8mL de solução de corante amarelo para alimentos (tintanil) 1%, uma gema de ovo e dois litros de leite.

Os ingredientes foram homogeneizados e aquecidos sob agitação até a obtenção de um creme com consistência adequada ao uso de confeitaria. O creme foi dividido em dois lotes e distribuídos em frascos Becker com 100g cada. Um dos lotes foi autoclavado por 15 minutos a 121°C, e o outro utilizado diretamente, e assim, deu-se continuidade ao mesmo tratamento efetuado para os outros alimentos testados.

Uma amostra controle, não inoculada, foi utilizada para cada alimento estudado (leite em pó, presunto cozido e creme de confeitaria), e a contagem do número de microrganismos mesófilos e estafilococos foi verificada durante o experimento. Isto foi realizado, com o objetivo de uma comparação e avaliação do desenvolvimento dos microrganismos e produção de enterotoxinas nas amostras experimentalmente inoculadas, e também para que não houvessem dúvidas quanto a capacidade de produção de enterotoxinas pelas linhagens inoculadas.

Para o leite em pó desnatado e presunto cozido foram adotadas no experimento, sempre a mesma marca comercial dos produtos.

Medidas de pH foram tomadas para cada amostra de alimento utilizado no experimento, nos diferentes períodos de tempo e temperaturas de incubação.

3.2.4 - Contagem da Microbiota Mesófila e Estafilococos nas Amostras de Alimentos

A contagem do número de microrganismos mesófilos foi realizada através do método padrão em placas com meio PCA, e de estafilococos, conforme método de inoculação em superfície, obedecendo-se os diferentes períodos de tempo e temperaturas de incubação adotados no experimento, em meio seletivo e diferencial de Baird-Parker (APHA, 1984).

3.2.5 - Detecção de Enterotoxinas Produzidas pelas Linhagens de Estafilococos Coagulase Negativas, em Alimentos

Para a detecção e discriminação do tipo de enterotoxinas produzidas nas amostras de alimentos em estudo foi utilizado o ensaio de Aglutinação Reversa Passiva em Látex (RPLA) de acordo com FUJIKAWA and IGARASHI (1988), técnica esta, que se baseia na sensibilização de partículas de látex com anti-enterotoxinas específicas.

As amostras de alimentos, a serem analisadas foram submetidas a uma diluição 1:1, com solução de cloreto de sódio (0,85%), e homogeneizadas. Após, foram centrifugadas a 900 g por 30 minutos, à 4°C, e os sobrenadantes utilizados na detecção de enterotoxinas.

O ensaio foi realizado em duplicata, utilizando-se tomadas de 25µL da amostra a ser pesquisada, que foram aplicadas aos orifícios da placa de microtitulação, para posterior adição de outros 25µL de solução de partículas de látex sensibilizadas com anticorpo específico. A placa de microtítulo, uma vez inoculada, foi mantida por até 24 horas a temperatura ambiente, sem agitação. A leitura foi procedida contra um fundo negro. Este método é considerado simples e sensível (0,25ng/mL). O kit utilizado SET-RPLA (Oxoid) detecta as enterotoxinas do tipo A, B, C e D, somente.

Com a aquisição pelo Laboratório de Toxinas Microbianas, FEA, UNICAMP, do equipamento mini-Vidas da bio Mérieux, com recursos fornecidos pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), todas as amostras de alimentos foram testadas, paralelamente, quanto a presença de

enterotoxinas, tendo em vista a comparação de resultados fornecidos pelas duas metodologias.

O Sistema Vidas alia a moderna automatização de diferentes testes unitários executados simultaneamente com a metodologia ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). Este ensaio imunológico é similar ao ELISA, apresentando como diferença o substrato 4 MUP, 4 Metil Umbeliferil Fosfato, que após ser hidrolizado pela enzima fosfatase alcalina, se transforma em umbeliferona, emitindo fluorescência a 450nm, quando excitada a 370nm. A intensidade de fluorescência liberada é medida, e determina o resultado. Os testes tornam-se, portanto, mais sensíveis, uma vez que a mínima formação do hidrolizado produz sinais de fluorescência detectáveis. A maior especificidade dos testes ELFA é dada em função do tipo de reação realizada (sanduíche indireto, sanduíche direto, competição e imunocaptura), dependendo da pesquisa realizada (Manual Mini Vidas).

A utilização do sistema depende exclusivamente do equipamento e reagentes. O equipamento Mini-Vidas, responsável pela realização de todas as etapas da reação até a leitura final (pipetagem, lavagens e leitura). Apresenta-se dividido em 02 compartimentos independentes, onde cada um possui 06 canais que possibilitam a execução simultânea de 06 testes. A capacidade total de execução simultânea, portanto, é de 12 testes.

As câmaras de reação são compostas por ponteiras cônicas, nas quais está adsorvido o anticorpo de captura, e um cartucho composto por nove compartimentos, nos quais estão presentes os demais reagentes utilizados na reação (tampão de lavagem, conjugado e substrato).

Para proceder a análise, a amostra é colocada no primeiro compartimento do cartucho, a ponteira imerge automaticamente na amostra sendo aspirada e refluída várias vezes, permitindo que ocorra a reação entre o antígeno solúvel na amostra e o anticorpo adsorvido na ponteira. O cartucho desloca-se horizontalmente para a próxima etapa, que corresponde ao descarte da amostra, onde foram capturados os antígenos, mecanicamente o cartucho desloca-se e o conjugado é aspirado pela ponteira, realizando os mesmos movimentos de aspiração e refluxo, e o procedimento segue o mesmo mecanismo até a última etapa onde o substrato será hidrolisado.

Quanto a revelação da reação, o 4 MUP, em presença da enzima fosfatase alcalina, sofre hidrólise e transforma-se em umbeliferona. O produto final é devolvido à cúpula de leitura, sofrendo uma excitação a 370 nm, emitindo uma fluorescência a 450 nm, cuja intensidade é captada por um sensor. O RFV (Valor Relativo de Fluorescência) é calculado e convertido pelo computador em resultado final do teste.

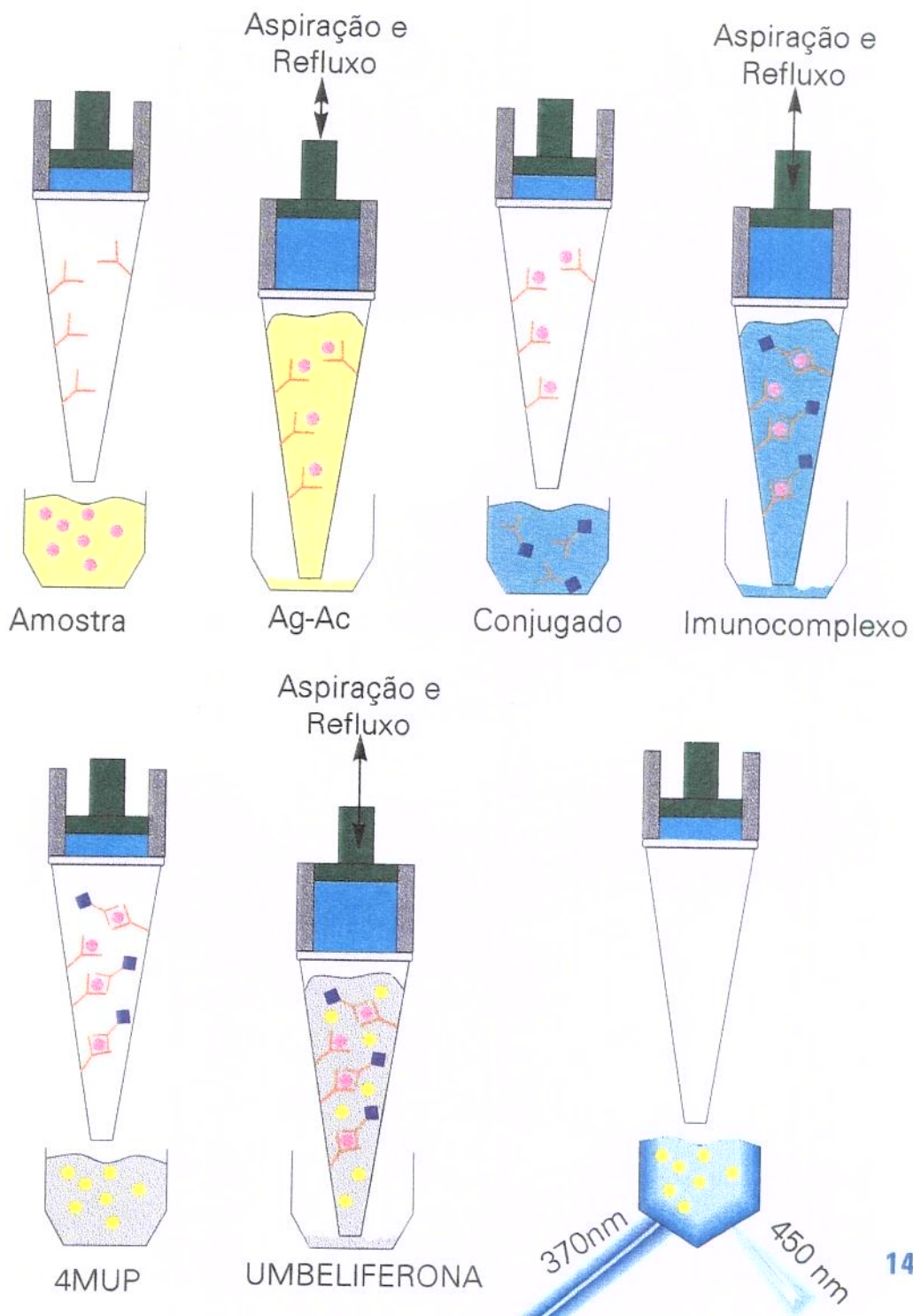
O resultado do teste corresponde ao valor do sobrenadante dividido pelo valor de fluorescência relativo padrão ou (RFV), qualquer resultado com leitura $< 0,13$ é considerado negativo. Este teste tem sensibilidade de 1ng/g (VERNOZY-ROZAND et al., 1998). As enterotoxinas detectadas são do tipo A, B, C, D, e E. É um método qualitativo, sendo os resultados interpretados como positivo ou negativo.

Para a obtenção dos extratos para a análise, as amostras de presunto cozido e creme de confeitaria foram homogeneizadas com tampão apropriado (2,5 mol/L TRIS; 10g/L tween e 10 g/l azida sódica), em uma diluição 1:1. Após, procedeu-se a centrifugação, em tubos de filtração apropriados, de 2

mL da suspensão, a 494 g por 15 minutos, à 4°C. O pH do filtrado foi ajustado entre 6 – 8, quando necessário. Para a leitura dos resultados, 0,5 mL do filtrado foi removido e colocado em orifício apropriado, presente no cartucho que contém os reagentes para a leitura pelo mini-Vidas

As amostras de leite em pó reconstituído foram utilizadas diretamente, isto é, não foram diluídas com o tampão. Para inativar a enzima, fosfatase alcalina endógena, presente em leite não pasteurizado, que poderia interferir com o resultado do ensaio, o filtrado foi aquecido a 80°C por 3 minutos. Para o teste, 2 mL da amostra foi centrifugada, em tubos de filtração apropriados, a 494 g por 15 minutos, à 4°C, e o filtrado ajustado a um pH entre 6 – 8. Após, 0,5mL do filtrado foi utilizado para a leitura dos resultados.

Esquema do Método ELFA



3.2.6 – Análise Estatística

A variável dependente (número de estafilococos coagulase negativos) foi transformada pelo logaritmo na base 10, devido a grande amplitude de variação dos valores desta variável. Em seguida foi feita análise descritiva exploratória para cada um dos três alimentos, através dos gráficos box-plot para a variável logaritmo na base dez do número de estafilococos coagulase negativos.

Para a análise estatística dos dados encontrados referentes ao desenvolvimento dos estafilococos coagulase negativos nos três alimentos estudados (leite em pó desnatado, presunto cozido e creme de confeitaria) utilizou-se a análise de variância multivariada com medidas repetidas, ou seja, considerando-se emparelhamento nos diversos tempos de coleta, 12, 24, 48 e 72 horas (JOHNSON & WICHERN, 1982; DUNN & CLARK, 1987).

Com os resultados da análise de variância multivariada foi realizada em seguida, a análise de variância a três vias (DUNN & CLARK, 1987) em cada um dos tempos de coleta. As variáveis analisadas foram temperatura de incubação (25°, 30° e 37°C), fonte (origem bovina e origem humana), e tipo (amostras tratadas e não tratadas termicamente) e descritas em gráficos box-plot, após estratificação para as variáveis que se mostraram significativas.

O software para a análise dos dados foi o "SPSS for Windows" versão 7.5 e o nível de significância utilizado foi 0,05.

A análise estatística dos dados foi realizada pelo CEMICAMP (Centro de Pesquisas e Controle das Doenças Materno Infantis de Campinas), Faculdade de Medicina – Unicamp – Campinas, SP.

4 - RESULTADOS

4.1 – Identificação das Linhagens de Estafilococos Coagulase Negativas Estudadas

Os resultados que definem o perfil bioquímico das dez linhagens estudadas são mostrados na Tabela 01. Como foram escolhidas ao acaso, houve a repetição de linhagens diferentes, mas da mesma espécie. As espécies identificadas foram: *S. xylosus* (2), *S. warneri* (1), *S. hyicus* (1) e *S. chromogenes* (1) de origem bovina, e *S. epidermidis* (3), *S. warneri* (1), *S. hominis* (1), de origem humana.

Com exceção da produção das enzimas Dnase, TNase e coagulase, os outros testes descritos na Tabela 01 foram realizados utilizando-se o Sistema Api-Staph.

Quanto a produção de Dnase e Tnase pode-se verificar que para as espécies de origem bovina, *S.xylosus*, *S.hyicus* e *S.chromogenes*, e *S.epidermidis*, de origem humana, o teste foi positivo, enquanto que para as outras espécies o teste foi negativo, com exceção de *S.epidermidis*, de origem humana, que apresentou resultado fracamente positivo.

A produção da enzima coagulase confirmou-se negativa para todas as linhagens. A negatividade deste teste foi condição principal para que estas linhagens enterotoxigênicas fossem escolhidas, para a realização deste trabalho.

Na Tabela 02 pode-se observar os tipos de enterotoxinas produzidas pelas linhagens identificadas. As enterotoxinas foram produzidas pelas linhagens em meio de cultura contendo extrato de levedura mais triptona e detectadas utilizando-se o ensaio de RPLA. Verificou-se que das dez linhagens escolhidas, 4 produziram em meio de cultura laboratorial, mais de um tipo de enterotoxina, sendo elas a EEA, EEC e EED. Para nenhuma linhagem foi verificada a produção da enterotoxina do tipo B, pelo método de detecção RPLA.

Tabela 01 – Características bioquímicas das dez linhagens de estafilococos coagulase negativas estudadas.

Testes	Origem									
	Bovina					Humana				
	S. xylosus	S. warneri	S. hyicus	S. xylosus	S. chromogenes	S. epidermidis	S. warneri	S. epidermidis	S. epidermidis	S. hominis
Coagulase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dnase	+	-	+	+	+	-	-	+/-	+	-
Tnase	+	-	+	+	+	-	-	+/-	+	-
Acidificação a partir de:										
D-glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Manose	+	-	+	+	+	+/-	-	+/-	+	-
Maltose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
D-trealose	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
D-Manitol	+	+/-	-	+	+	-	-	-	-	-
D-Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-metil-D-glucose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
N-acetil-glicose	-	-	+	-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-
Redução de	+	+	+	+	-	+	+/-	+	+/-	+
Nitrato										
Fosfatase alcalina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	-	+	+	-	+	+	+	+	+/-	+
Uréia	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Produção de Acetoína	+	+	-	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+

¹ Leite; mãos e nasofaringe de manipuladores, correspondendo a origem bovina e humana, respectivamente

Tabela 02– Identificação de linhagens de estafilococos coagulase negativas isoladas de leite bovino e manipuladores de alimentos e respectivas enterotoxinas produzidas em condições de cultivo laboratorial.

<i>Staphylococcus</i> Identificados¹	Tipos de enterotoxinas
<i>xylosus</i> – 01	EEA, EEC e EED
<i>warneri</i> – 02	EEA
<i>hyicus</i> – 03	EEA, EEC e EED
<i>xylosus</i> – 04	EEA
<i>chromogenes</i> – 05	EEC e EED
<i>epidermidis</i> – 06	EED
<i>warneri</i> – 07	EEA, EEC e EED
<i>epidermidis</i> – 08	EEC
<i>epidermidis</i> – 09	EED
<i>hominis</i> – 10	EED

1- As cinco primeiras espécies descritas no quadro foram provenientes de leite bovino e as cinco restantes isoladas de manipuladores de alimentos.

4.2 – Contagem Inicial de Microrganismos nas Amostras Controle dos Alimentos

O número de microrganismos mesófilos e estafilococos encontrados nas amostras controle está apresentado na Tabela 03.

Pode ser observado que nas amostras de presunto o índice inicial de contaminação foi muito alto, o mesmo não ocorrendo para as amostras de leite e creme de confeitaria. Após 12 horas de incubação, o número de mesófilos nas amostras apresentou contagens da ordem de 10^4 UFC/mL para o leite, 10^6 UFC/g para o creme e o presunto atingindo 10^8 UFC/g.

Tabela 03 – Média da contagem de microrganismos mesófilos, em PCA, e estafilococos, em ágar BP, nas amostras controle dos alimentos (leite, presunto cozido e creme de confeitaria) empregados no experimento.

Tempo de Incubação (horas)	Média das Contagens					
	Leite (UFC/mL)		Presunto (UFC/g)		Creme de Confeitaria (UFC/g)	
	PCA	BP	PCA	BP	PCA	BP
0	< 10	<10	$8,8 \times 10^5$	<10	<10	<10
12	$5,2 \times 10^4$	<10	$1,1 \times 10^8$	$2,3 \times 10^3$	$7,6 \times 10^6$	<10
24	$6,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^2$	$3,1 \times 10^8$	$4,1 \times 10^5$	$1,7 \times 10^7$	$4,8 \times 10^3$
48	$7,2 \times 10^6$	$2,3 \times 10^2$	$5,0 \times 10^8$	$6,1 \times 10^6$	$6,3 \times 10^7$	$2,3 \times 10^3$
72	$2,3 \times 10^6$	$3,1 \times 10^2$	$4,2 \times 10^8$	$3,2 \times 10^6$	$6,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$

4.3 – Comportamento das Linhagens de Estafilococos Coagulase Negativas, em Alimentos

4.3.1 – Em Leite em Pó Desnatado

Nas tabelas 04 e 05 estão apresentados os valores em UFC/mL das contagens de estafilococos inoculados (10^3 UFC/mL) em amostras de leite tratadas e não tratadas termicamente. Nas amostras não tratadas termicamente, também foi realizada, a contagem de mesófilos.

O crescimento dos microrganismos inoculados foi progressivo nas três temperaturas, sendo que a 37°C houve um melhor desenvolvimento. Em 12 horas de incubação os níveis populacionais alcançaram $10^6 - 10^7$ UFC/mL, enquanto que a 25°C somente foi observado

o mesmo número após 24 e 48 horas de incubação. A partir de 48 horas, o crescimento populacional manteve-se constante nas 3 temperaturas estudadas.

O mesmo não foi observado para a contagem de mesófilos, que apresentou aumento do número de microrganismo até 72 horas de incubação.

O pH inicial das amostras de leite ficou ao redor de 6,6 e com o decorrer do período de incubação o valor caiu para 4,8 nas amostras não tratadas termicamente, enquanto que para as tratadas, permaneceu ao redor de 6,0.

A deterioração nas amostras de leite não tratadas termicamente foi verificada após 24 horas de incubação, o mesmo não ocorrendo nas que sofreram tratamento térmico.

4.3.2 – Em Presunto Cozido

O presunto foi adquirido semanalmente em supermercados da região e o inóculo inicial utilizado foi de 10^3 UFC/g. A contagem inicial de mesófilos nas amostras de presunto foi maior em relação à encontrada nas amostras de leite. Como pode ser observado nas Tabelas 06 e 07, a contagem foi monitorada em até 72 horas de incubação, quando alcançou valores de até 10^{10} UFC/g.

Nas amostras de presunto não tratadas termicamente, não foi possível observar o crescimento da linhagem 03 (*S. hyicus*) à temperatura de 25°C e 30°C, das linhagens 08 e 09 (*S. epidermidis*) na temperatura de 37°C e da linhagem 10 (*S. hominis*) à temperatura de 25°C, após 48 horas de incubação. Em 72 horas de incubação não se observou aumento na população das linhagens 02, 03, 06, 07 e 10 à temperatura de 25°C; 03 e 07 à 30°C e 03, 04, 07, e 08 à 37°C.

A linhagem 05 (*S. chromogenes*) cresceu de forma acentuada e constante nas diferentes temperaturas e tempos de incubação, tanto nas amostras tratadas quanto nas não tratadas termicamente. O pH das amostras analisadas ficou em torno de 6,0.

4.3.3 – Em creme de confeitaria

O creme foi produzido no próprio laboratório, sob condições de higiene. Um inóculo inicial de 10^3 UFC/g das linhagens estudadas foi utilizado. A contagem de mesófilos nas amostras não tratadas termicamente foi semelhante a contagem de estafilococos, Tabelas 08 e 09, às mesmas condições.

Da mesma maneira, ao observado nas amostras de leite, o crescimento populacional de estafilococos, aumentou até 24 horas de incubação, sendo que após, manteve-se constante.

Nas três temperaturas de incubação estudadas, observou-se o desenvolvimento das espécies inoculadas, sendo que em 12 horas de incubação à 37°C o número de estafilococos já havia alcançado valores de 10^7 UFC/g, e as temperaturas de 25°C e 30°C números semelhantes foram atingidos após 24 horas de incubação.

Também foi verificado que nas amostras de creme de confeitaria não tratadas termicamente, após 24 horas de incubação foi visível a deterioração das mesmas.

O pH inicial das amostras de creme de confeitaria ficou em torno de 6,5, diminuindo após o período de incubação, chegando algumas amostras a apresentar um pH ao redor de 4,9.

Tabela 04 – Comportamento de estafilococos coagulase negativos inoculados (10^3 UFC/mL) e contagem de mesófilos em leite em pó desnatado mantidos em 25, 30 e 37°C, após 12 e 24 horas de incubação.

		Temperatura de Incubação (°C)								
T(h)	Cepa	25			30			37		
		N/T ¹		T ²	N/T		T	N/T		T
		PCA ³	BP ⁴	BP	PCA	BP	BP	PCA	BP	BP
12	01	$2,3 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	$5,7 \times 10^5$	$5,4 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$	$5,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$
	02	$5,1 \times 10^6$	$9,9 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^7$	$4,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$8,8 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$5,5 \times 10^6$
	03	$9,7 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$	$5,7 \times 10^7$	$5,1 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$
	04	$1,4 \times 10^8$	$8,0 \times 10^4$ *	$2,0 \times 10^4$	$1,9 \times 10^8$	$4,0 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$3,0 \times 10^8$	$2,6 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$
	05	$1,5 \times 10^7$	$4,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$7,6 \times 10^6$	$2,2 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$	$6,8 \times 10^6$	$5,9 \times 10^6$
	06	$4,1 \times 10^4$	$5,5 \times 10^3$	$4,2 \times 10^3$	$1,4 \times 10^7$	$7,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$4,7 \times 10^7$	$5,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
	07	$9,7 \times 10^5$	$9,6 \times 10^4$	$9,7 \times 10^4$	$5,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$7,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$
	08	$2,3 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$2,8 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	$1,8 \times 10^6$
	09	$3,0 \times 10^5$	$3,2 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$	$3,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$7,6 \times 10^7$	$9,8 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$
	10	$1,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$9,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$5,5 \times 10^3$	$4,1 \times 10^7$	$3,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$
24	01	PCA	BP	BP	PCA	BP	BP	PCA	BP	BP
	02	$2,3 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$9,1 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
	03	$4,2 \times 10^4$	$7,2 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$2,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$	$9,1 \times 10^6$	$9,5 \times 10^8$	$1,9 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
	04	$4,2 \times 10^7$	$5,1 \times 10^6$	$5,5 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^9$	$1,3 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$
	05	$3,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$7,8 \times 10^7$	$5,0 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$6,1 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	$4,1 \times 10^6$
	06	$1,1 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$2,6 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	$4,1 \times 10^7$	$6,3 \times 10^7$
	07	$3,6 \times 10^7$	$2,6 \times 10^6$	$3,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$6,3 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
	08	$1,8 \times 10^7$	$2,8 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$5,2 \times 10^7$	$7,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8$	$3,6 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$
	09	$8,1 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6$	$5,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$9,4 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$
	10	$2,6 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$	$6,3 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$9,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$
		$1,5 \times 10^6$	$5,5 \times 10^5$	$7,7 \times 10^5$	$3,1 \times 10^7$	$4,8 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8$	$8,3 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$

¹ - Amostras do alimento não tratadas termicamente, ² - amostras tratadas termicamente

³ - Contagem de microrganismos totais em PCA; ⁴ - Contagem de *Staphylococcus* em Baird-Parker

* Crescimento de colônias não características de *Staphylococcus*

Tabela 05 – Comportamento de estafilococos coagulase negativos inoculados (10^3 UFC/mL) e contagem de mesófilos em leite em pó desnatado mantidos em 25, 30 e 37°C, após 48 e 72 horas de incubação.

		Temperatura de Incubação °C								
		25			30			37		
T(h)	Cepa	N/T ¹		T ²	N/T		T	N/T		T
		PCA ³	BP ⁴	BP	PCA	BP	BP	PCA	BP	BP
48	01	$7,0 \times 10^7$	$8,1 \times 10^6$	$8,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$8,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$3,0 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$
	02	$2,1 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	$5,6 \times 10^6$	$6,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^6$	$8,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
	03	$2,3 \times 10^8$	$1,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$4,0 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7$	$1,3 \times 10^6$	$1,8 \times 10^8$	$4,0 \times 10^4$	$1,9 \times 10^6$
	04	$4,8 \times 10^8$	$9,0 \times 10^{6*}$	$6,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^8$	$5,6 \times 10^6$	$9,9 \times 10^6$	$5,6 \times 10^8$	$1,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$
	05	$4,3 \times 10^8$	$4,1 \times 10^7$	$3,3 \times 10^7$	$1,0 \times 10^9$	$5,1 \times 10^7$	$6,7 \times 10^7$	$1,4 \times 10^9$	$6,9 \times 10^7$	$6,1 \times 10^7$
	06	$3,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	$5,6 \times 10^6$	$2,6 \times 10^8$	$4,2 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	$4,7 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
	07	$6,4 \times 10^7$	$5,7 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^8$	$2,0 \times 10^7$	$3,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8$	$8,3 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$
	08	$1,9 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$	$8,3 \times 10^6$	$2,9 \times 10^8$	$6,4 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
	09	$1,6 \times 10^8$	$6,7 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$1,8 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$5,4 \times 10^8$	$5,9 \times 10^5$	$2,2 \times 10^7$
	10	$3,6 \times 10^8$	$7,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$	$1,7 \times 10^8$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^8$	$9,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$
72		PCA	BP	BP	PCA	BP	BP	PCA	BP	BP
	01	$6,2 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$1,6 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$
	02	$1,3 \times 10^9$	$5,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$1,5 \times 10^9$	$3,4 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^9$	$3,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^7$
	03	$1,6 \times 10^8$	$2,1 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	$5,2 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{5*}$	$3,7 \times 10^6$	$4,7 \times 10^8$	$2,9 \times 10^{4*}$	$5,2 \times 10^6$
	04	$1,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	$2,6 \times 10^8$	$5,6 \times 10^{6*}$	$9,9 \times 10^6$	$3,5 \times 10^8$	$1,6 \times 10^{5*}$	$1,2 \times 10^7$
	05	$2,3 \times 10^8$	$3,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$1,8 \times 10^8$	$2,1 \times 10^6$	$6,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$
	06	$4,1 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$2,0 \times 10^7$	$7,8 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,3 \times 10^7$
	07	$6,2 \times 10^7$	$2,9 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$	$2,3 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$	$7,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^8$	$1,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
	08	$8,1 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$3,2 \times 10^8$	$1,4 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$	$7,8 \times 10^7$	$9,4 \times 10^6$	$7,9 \times 10^6$
	09	$5,8 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$	$8,3 \times 10^6$	$7,7 \times 10^7$	$5,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$3,1 \times 10^4$	$3,1 \times 10^7$
	10	$9,0 \times 10^7$	$8,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$	$2,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$	$3,1 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$

¹ - Amostras do alimento não tratadas termicamente, ² - amostras tratadas termicamente

³ - Contagem de microrganismos totais em PCA; ⁴ - Contagem de *Staphylococcus* em Baird-Parker

Tabela 06 – Comportamento de estafilococos coagulase negativos inoculados (10^3 UFC/mL) e contagem de mesófilos em presunto cozido mantidos em 25, 30 e 37°C, após 12 e 24 horas de incubação.

		Temperatura de Incubação °C								
T(h)	Cepa	25			30			37		
		N/T ¹		T ²	N/T		T	N/T		T
		PCA ³	BP ⁴	BP	PCA	BP	BP	PCA	BP	BP
12	01	$4,5 \times 10^7$	$1,7 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	$3,0 \times 10^8$	$2,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$2,0 \times 10^8$	$7,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$
	02	$6,0 \times 10^6$	$3,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$5,4 \times 10^7$	$1,8 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^8$	$4,7 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$
	03	$2,0 \times 10^8$	$2,5 \times 10^5$	$4,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^7$	$3,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^7$	$3,2 \times 10^8$	$3,9 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$
	04	$6,3 \times 10^7$	$5,3 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$9,1 \times 10^7$	$5,3 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
	05	$3,1 \times 10^8$	$1,8 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	$4,1 \times 10^8$	$8,5 \times 10^6$	$8,3 \times 10^6$	$6,4 \times 10^7$	$9,3 \times 10^6$	$9,1 \times 10^6$
	06	$2,8 \times 10^8$	$3,0 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$7,9 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$8,0 \times 10^5$	$4,3 \times 10^8$	$1,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
	07	$6,9 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$	$5,6 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$2,9 \times 10^8$	$5,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^6$
	08	$8,8 \times 10^7$	$4,7 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$	$9,8 \times 10^8$	$5,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^8$	$3,0 \times 10^4$	$2,3 \times 10^6$
	09	$1,1 \times 10^8$	$2,1 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5$	$9,6 \times 10^7$	$4,7 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,7 \times 10^8$	$1,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^6$
	10	$8,3 \times 10^7$	$2,0 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^8$	$7,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8$	$1,1 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$
24	01	PCA	BP	BP	PCA	BP	BP	PCA	BP	BP
	02	$3,3 \times 10^8$	$5,0 \times 10^5$	$3,2 \times 10^7$	$8,5 \times 10^7$	$1,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^7$
	03	$4,8 \times 10^8$	$3,2 \times 10^4$	$6,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^6$	$5,5 \times 10^7$	$1,6 \times 10^9$	$9,5 \times 10^7$	$9,3 \times 10^7$
	04	$6,0 \times 10^8$	$3,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^7$	$6,4 \times 10^8$	$6,2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	$4,1 \times 10^9$	$3,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^7$
	05	$6,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^5$	$3,7 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$4,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^8$	$7,8 \times 10^7$	$2,0 \times 10^5$	$8,4 \times 10^7$
	06	$4,3 \times 10^8$	$3,9 \times 10^7$	$4,0 \times 10^8$	$7,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$3,9 \times 10^8$	$8,8 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
	07	$1,1 \times 10^8$	$8,0 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7$	$2,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$	$9,6 \times 10^6$	$7,2 \times 10^7$
	08	$1,4 \times 10^8$	$2,2 \times 10^3$	$1,4 \times 10^5$	$2,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$	$3,9 \times 10^7$
	09	$6,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^8$	$4,7 \times 10^8$	$3,5 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^8$
	10	$1,6 \times 10^8$	$4,0 \times 10^5$	$9,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	$6,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^8$	$8,5 \times 10^8$	$6,4 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$
	10	$1,6 \times 10^8$	$6,5 \times 10^5$	$3,7 \times 10^6$	$4,2 \times 10^8$	$3,0 \times 10^5$	$5,3 \times 10^7$	$2,7 \times 10^8$	$5,2 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$

¹ - Amostras do alimento não tratadas termicamente, ² - amostras tratadas termicamente

³ - Contagem de microrganismos totais em PCA; ⁴ - Contagem de *Staphylococcus* em Baird-Parker

Tabela 07 – Comportamento de estafilococos coagulase negativos inoculados (10^3 UFC/mL) e contagem de mesófilos em presunto cozido mantidos em 25, 30 e 37°C, após 48 e 72 horas de incubação.

		Temperatura de Incubação °C								
T(h)	Cepa	25			30			37		
		N/T ¹		T ²	N/T		T	N/T		T
		PCA ³	BP ⁴	BP	PCA	BP	BP	PCA	BP	BP
48	01	$7,4 \times 10^8$	$1,3 \times 10^6$	$6,3 \times 10^7$	$4,4 \times 10^9$	$1,6 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$	$1,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^8$
	02	$1,9 \times 10^9$	$2,0 \times 10^5$	$8,7 \times 10^7$	$5,1 \times 10^8$	$2,9 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$	$7,6 \times 10^6$	$6,3 \times 10^7$
	03	$1,3 \times 10^9$	<10	$3,2 \times 10^7$	$7,3 \times 10^8$	<10	$4,3 \times 10^7$	$6,7 \times 10^8$	$1,9 \times 10^5$	$7,6 \times 10^7$
	04	$1,4 \times 10^8$	$1,9 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$	$2,0 \times 10^6$	$6,1 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	$9,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7$
	05	$2,1 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$	$9,6 \times 10^7$	$9,6 \times 10^7$	$3,5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$
	06	$1,7 \times 10^8$	$4,2 \times 10^7$	$7,9 \times 10^7$	$4,2 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	$8,3 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$
	07	$7,7 \times 10^8$	$4,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$	$6,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^7$	$4,7 \times 10^8$	$1,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$
	08	$1,5 \times 10^8$	$7,0 \times 10^5$	$9,8 \times 10^7$	$3,7 \times 10^8$	$8,0 \times 10^5$	$9,4 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$	<10	$1,3 \times 10^8$
	09	$3,5 \times 10^8$	$9,0 \times 10^6$	$8,3 \times 10^7$	$8,8 \times 10^8$	$9,0 \times 10^5$	$9,1 \times 10^7$	$1,4 \times 10^9$	<10	$1,4 \times 10^7$
	10	$2,6 \times 10^9$	<10	$9,4 \times 10^7$	$3,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$2,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^8$
72		PCA	BP	BP	PCA	BP	BP	PCA	BP	BP
	01	$1,3 \times 10^9$	$1,8 \times 10^5$	$8,2 \times 10^7$	$2,8 \times 10^9$	$3,3 \times 10^7$	$6,2 \times 10^7$	$2,6 \times 10^{10}$	$9,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$
	02	$8,2 \times 10^8$	<10	$1,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^9$	$5,0 \times 10^6$	$8,6 \times 10^7$	$1,4 \times 10^9$	$3,0 \times 10^6$	$4,7 \times 10^7$
	03	$5,8 \times 10^9$	<10	$5,4 \times 10^7$	$4,1 \times 10^9$	<10	$1,5 \times 10^7$	$5,7 \times 10^9$	<10	$7,1 \times 10^7$
	04	$8,1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^5$	$5,1 \times 10^7$	$5,9 \times 10^8$	$6,0 \times 10^4$	$4,9 \times 10^7$	$4,1 \times 10^8$	<10	$2,2 \times 10^7$
	05	$2,1 \times 10^9$	$2,7 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$	$4,0 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$	$2,4 \times 10^9$	$1,3 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$
	06	$7,1 \times 10^8$	<10	$1,2 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$2,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^8$	$6,7 \times 10^8$	$1,6 \times 10^6$	$6,3 \times 10^7$
	07	$4,5 \times 10^8$	<10	$3,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^9$	<10	$5,6 \times 10^7$	$1,0 \times 10^9$	<10	$2,5 \times 10^7$
	08	$4,6 \times 10^8$	$4,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^6$	$9,4 \times 10^7$	$6,2 \times 10^9$	<10	$2,6 \times 10^7$
	09	$1,4 \times 10^9$	$2,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^8$	$1,9 \times 10^9$	$1,9 \times 10^6$	$6,3 \times 10^7$	$1,5 \times 10^9$	$3,0 \times 10^5$	$5,3 \times 10^7$
	10	$7,3 \times 10^8$	<10	$1,6 \times 10^8$	$2,9 \times 10^9$	$1,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^9$	$3,1 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$

¹ - Amostras do alimento não tratadas termicamente, ² - amostras tratadas termicamente

³ - Contagem de microrganismos totais em PCA; ⁴ - Contagem de *Staphylococcus* em Baird-Parker

Tabela 08 – Comportamento de estafilococos coagulase negativos inoculados (10^3 UFC/mL) e contagem de mesófilos em creme de confeitaria mantidos em 25, 30 e 37°C, após 12 e 24 horas de incubação.

		Temperatura de Incubação °C								
T(h)	Cepa	25			30			37		
		N/T ¹		T ²	N/T		T	N/T		T
		PCA ³	BP ⁴	BP	PCA	BP	BP	PCA	BP	BP
12	01	$6,4 \times 10^7$	$6,7 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$2,9 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$
	02	$4,2 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$4,8 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7$
	03	$2,9 \times 10^7$	$1,8 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$8,2 \times 10^7$	$6,5 \times 10^6$	$6,9 \times 10^6$	$1,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$	$7,8 \times 10^6$
	04	$5,4 \times 10^7$	$6,6 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$1,3 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
	05	$8,2 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	$9,9 \times 10^6$	$9,8 \times 10^8$	$2,6 \times 10^5$	$3,2 \times 10^7$	$5,6 \times 10^8$	$3,4 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$
	06	$8,1 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$2,6 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	$3,4 \times 10^6$	$2,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$
	07	$3,2 \times 10^8$	$3,1 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$8,7 \times 10^7$	$3,6 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	$8,0 \times 10^7$	$5,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$
	08	$1,1 \times 10^7$	$1,4 \times 10^6$	$1,9 \times 10^5$	$7,6 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$4,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^8$	$2,2 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$
	09	$1,4 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$2,9 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8$	$3,1 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$	$2,6 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$
	10	$4,2 \times 10^6$	$5,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$	$2,6 \times 10^8$	$1,8 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$
24	01	PCA	BP	BP	PCA	BP	BP	PCA	BP	BP
	01	$4,7 \times 10^8$	$4,8 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$	$4,1 \times 10^8$	$4,8 \times 10^7$	$5,7 \times 10^7$	$6,2 \times 10^8$	$5,7 \times 10^7$	$7,6 \times 10^7$
	02	$1,9 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$	$6,4 \times 10^7$	$3,2 \times 10^8$	$5,5 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$	$4,1 \times 10^8$	$5,5 \times 10^7$	$9,4 \times 10^7$
	03	$5,2 \times 10^7$	$7,4 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$	$7,6 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$3,5 \times 10^6$	$7,1 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	$9,4 \times 10^6$
	04	$2,4 \times 10^6$	$2,8 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	$6,2 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$4,1 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$
	05	$2,0 \times 10^8$	$5,6 \times 10^7$	$5,7 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	$4,9 \times 10^7$	$6,7 \times 10^7$	$3,9 \times 10^8$	$5,3 \times 10^7$	$9,4 \times 10^7$
	06	$1,5 \times 10^8$	$3,0 \times 10^7$	$6,2 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$	$4,1 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$9,5 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$4,7 \times 10^7$
	07	$2,4 \times 10^8$	$9,0 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$	$2,5 \times 10^8$	$8,9 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$4,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$	$5,5 \times 10^6$
	08	$1,4 \times 10^8$	$3,7 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$3,2 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	$8,1 \times 10^8$	$8,4 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$
	09	$5,8 \times 10^8$	$7,6 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$	$8,1 \times 10^8$	$6,4 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$	$1,1 \times 10^9$	$1,6 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
	10	$1,0 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$8,5 \times 10^6$	$1,8 \times 10^8$	$4,4 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$2,3 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$

¹ - Amostras do alimento não tratadas termicamente; ² - amostras termicamente tratadas

³ - Contagem de microrganismos totais em PCA; ⁴ - Contagem de *Staphylococcus* em Baird-Parker

Tabela 09– Comportamento de estafilococos coagulase negativos inoculados (10^3 UFC/mL) e contagem de mesófilos em creme de confeitaria mantidos em 25, 30 e 37°C, após 48 e 72 horas de incubação.

		Temperatura de Incubação °C								
		25			30			37		
T(h)	Cepa	N/T ¹		T ²	N/T		T	N/T		T
		PCA ³	BP ⁴	BP	PCA	BP	BP	PCA	BP	BP
48	01	$3,2 \times 10^8$	$6,1 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$	$3,9 \times 10^8$	$2,7 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$6,4 \times 10^8$	$5,9 \times 10^7$	$6,6 \times 10^7$
	02	$3,8 \times 10^8$	$1,4 \times 10^7$	$7,8 \times 10^7$	$3,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	$5,7 \times 10^8$	$2,8 \times 10^7$	$6,7 \times 10^6$
	03	$3,0 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$7,0 \times 10^5$	$2,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$6,2 \times 10^7$	$4,5 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$
	04	$8,8 \times 10^7$	$9,20 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$	$4,8 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	$1,9 \times 10^7$	$1,4 \times 10^6$
	05	$1,9 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$4,7 \times 10^7$	$2,4 \times 10^8$	$9,2 \times 10^7$	$5,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$5,1 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$
	06	$3,7 \times 10^8$	$6,3 \times 10^7$	$8,5 \times 10^7$	$6,3 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	$2,7 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$5,2 \times 10^7$
	07	$5,3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$2,4 \times 10^8$	$1,6 \times 10^6$	$7,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$
	08	$2,9 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$	$6,1 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$4,8 \times 10^7$	$3,5 \times 10^8$	$7,8 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$
	09	$1,5 \times 10^9$	$2,1 \times 10^8$	$9,3 \times 10^7$	$4,3 \times 10^8$	$7,7 \times 10^7$	$7,4 \times 10^7$	$6,8 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$
	10	$7,0 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$	$3,2 \times 10^6$	$3,1 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,9 \times 10^7$	$9,6 \times 10^8$	$4,0 \times 10^7$	$7,2 \times 10^6$
72	01	PCA	BP	BP	PCA	BP	BP	PCA	BP	BP
	01	$4,6 \times 10^8$	$7,8 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$8,2 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$
	02	$1,8 \times 10^8$	$1,3 \times 10^7$	$6,3 \times 10^6$	$5,4 \times 10^8$	$3,7 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$	$7,1 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$
	03	$2,2 \times 10^5$	$5,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	$8,5 \times 10^5$
	04	$9,6 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$9,3 \times 10^8$	$9,8 \times 10^7$	$1,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$5,3 \times 10^7$	$8,5 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$
	05	$2,5 \times 10^8$	$5,3 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$	$4,9 \times 10^8$	$2,0 \times 10^6$	$3,7 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$
	06	$2,1 \times 10^8$	$3,7 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	$6,5 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$
	07	$1,4 \times 10^8$	$2,5 \times 10^5$	$5,1 \times 10^6$	$7,2 \times 10^7$	$4,5 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$2,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	$5,1 \times 10^6$
	08	$5,3 \times 10^8$	$5,8 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$	$7,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	$8,3 \times 10^8$	$2,4 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$6,6 \times 10^6$
	09	$1,1 \times 10^8$	$6,7 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$	$2,9 \times 10^8$	$6,6 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	$8,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$
	10	$2,7 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$4,2 \times 10^7$	$5,7 \times 10^6$	$6,7 \times 10^7$	$8,3 \times 10^7$

¹ - Amostras do alimento não tratadas termicamente, ² – amostras tratadas termicamente

³ - Contagem de microrganismos totais em PCA; ⁴ – Contagem de *Staphylococcus* em Baird-Parker

4.4 – Estudo descritivo dos dados obtidos

Os dados obtidos neste trabalho foram submetidos a uma análise estatística. Primeiro será demonstrada análise descritiva dos dados obtidos.

Para uma primeira análise exploratória do crescimento dos microrganismos, pode-se verificar uma tendência de aumento do logaritmo do número de estafilococos ao longo do tempo, para cada um dos três alimentos (Gráficos 01, 02 e 03).

As Tabelas 10 a 12 mostram os valores descritivos do logaritmo do número de estafilococos encontrados, segundo o tempo, para os alimentos leite, presunto cozido e creme de confeitaria, respectivamente. As amostras tratadas e não tratadas termicamente foram analisadas conjuntamente, o mesmo ocorrendo para as amostras, nas três temperaturas.

Tabela 10 – Valores descritivos do logaritmo do número de estafilococos coagulase negativos incubados à 25°C, 30°C e 37°C, segundo o tempo para leite (amostras tratadas e não tratadas termicamente)

Medidas posição	Tempo (horas)			
	12	24	48	72
Mínimo	3,18	5,53	4,60	4,46
Percentil 25	5,05	6,56	6,28	6,27
Mediana	6,15	6,76	6,94	6,72
Percentil 75	6,73	7,08	7,50	7,07
Máximo	7,46	8,11	8,41	8,28
(n)	60	60	60	60

Tabela 11 – Valores descritivos do logaritmo do número de estafilococos coagulase negativos incubados à 25°C, 30°C e 37°C, segundo o tempo para presunto cozido (amostras tratadas e não tratadas termicamente)

Medidas posição	Tempo (horas)			
	12	24	48	72
Mínimo	3,11	3,34	0,00	0,00
Percentil 25	5,24	5,79	6,02	5,61
Mediana	5,69	7,52	7,20	7,37
Percentil 75	6,29	7,98	7,93	7,78
Máximo	7,96	8,60	8,23	8,23
(n)	60	60	60	60

Tabela 12 – Valores descritivos do logaritmo do número de estafilococos coagulase negativos incubados à 25°C, 30°C e 37°C, segundo o tempo para creme de confeitaria (amostras tratadas e não tratadas termicamente)

Medidas posição	Tempo (horas)			
	12	24	48	72
Mínimo	4,26	6,54	5,00	5,40
Percentil 25	6,56	7,22	6,83	6,71
Mediana	7,02	7,63	7,52	7,39
Percentil 75	7,28	7,77	7,88	7,81
Máximo	7,59	8,20	8,32	8,92
(n)	60	60	60	60

Gráfico 1 - Boxplot do logaritmo do número de estafilococos incubados a 25, 30 e 37°C segundo o tempo, para o leite tratado e não tratado termicamente

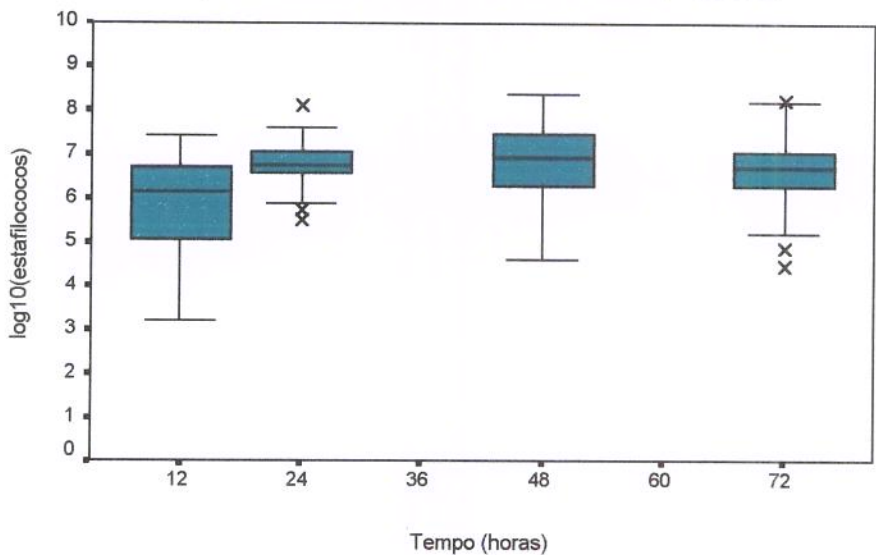


Gráfico 2 - Boxplot do logaritmo do número de estafilococos incubados a 25, 30 e 37°C segundo o tempo, para o presunto tratado e não tratado termicamente

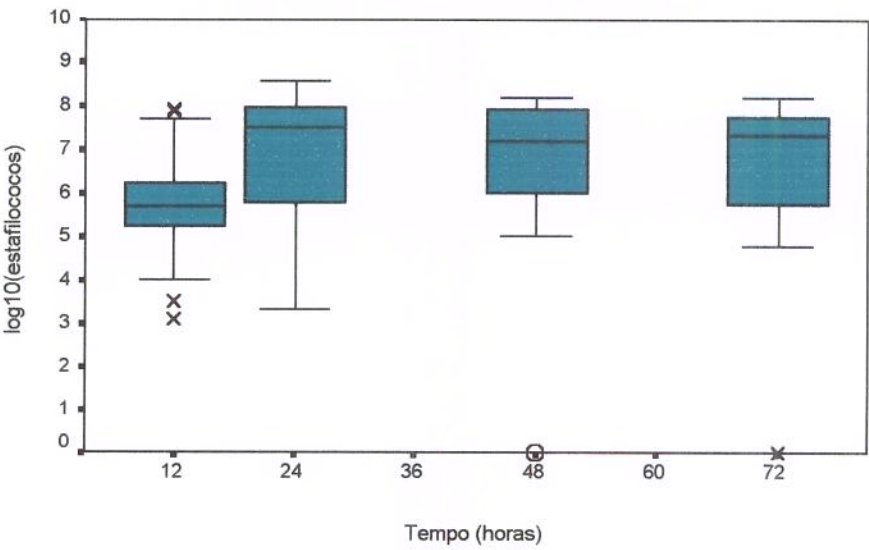
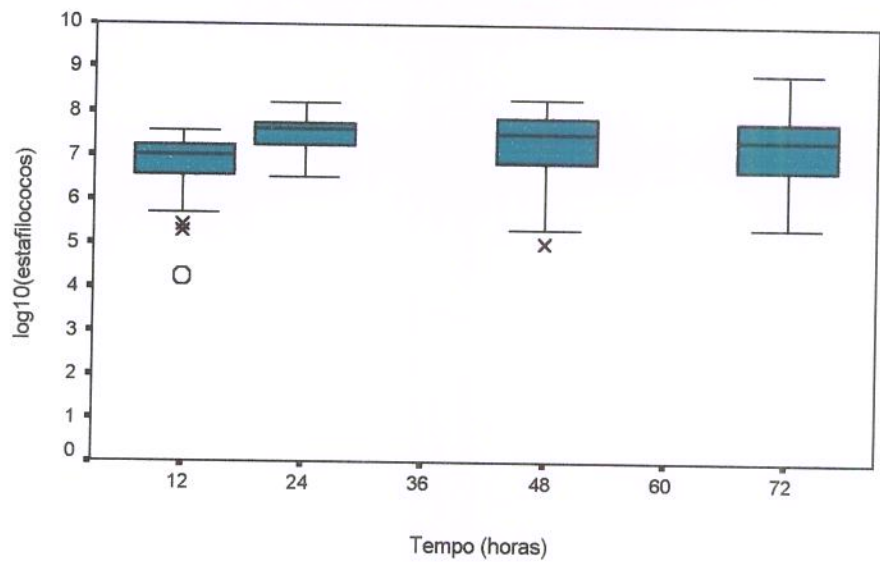


Gráfico 3 - Boxplot do logaritmo do número de estafilococos incubados a 25, 30 e 37°C segundo o tempo, para o creme tratado e não tratado termicamente



Observa-se nos Gráficos 01 a 03 que para os três alimentos estudados, houve um aumento na população de estafilococos inoculados até 24 horas de incubação, a partir desse período o crescimento manteve-se quase que constante.

No Gráfico 04 pode ser visualizado que as linhagens inoculadas em amostras de leite, após 12 horas de incubação apresentaram melhor crescimento à temperatura de 37°C, e após esse período, não se observou mais nenhuma diferença no desenvolvimento populacional, em relação à temperatura de incubação utilizada. No Gráfico 05 observa-se que para o mesmo período de incubação (12 horas) nas amostras de leite tratadas e não tratadas termicamente, houve um melhor desenvolvimento das linhagens provenientes de fonte bovina, isto é, a contagem do número de estafilococos foi maior. Após esse período de incubação, não se verificou diferença significativa na comparação do desenvolvimento de linhagens de estafilococos de origem bovina e humana.

Para as amostras de presunto cozido (Gráfico 06), observa-se um melhor desenvolvimento nas temperaturas de 30°C e 37°C em 12 e 24 horas de incubação, e a partir desse período não houve diferença no crescimento dos estafilococos coagulase negativos, em relação à temperatura. Verifica-se ainda que nos diferentes tempos de incubação, os estafilococos desenvolveram-se melhor nas amostras de presunto tratadas termicamente (Gráfico 07).

Nas amostras de creme de confeitaria, a temperatura em que melhor se desenvolveram os estafilococos foi 37°C, no período de 12 horas de incubação, a partir desse tempo não houve diferença significativa quanto às temperaturas estudadas (Gráfico 08). Em relação à fonte dos microrganismos,

nas primeiras 12 horas de incubação, as de origem bovina desenvolveram-se melhor que as de origem humana (Gráfico 09).

Gráfico 4 - Boxplot do logaritmo do número de estafilococos segundo o tempo e a temperatura, para o leite tratado e não tratado termicamente

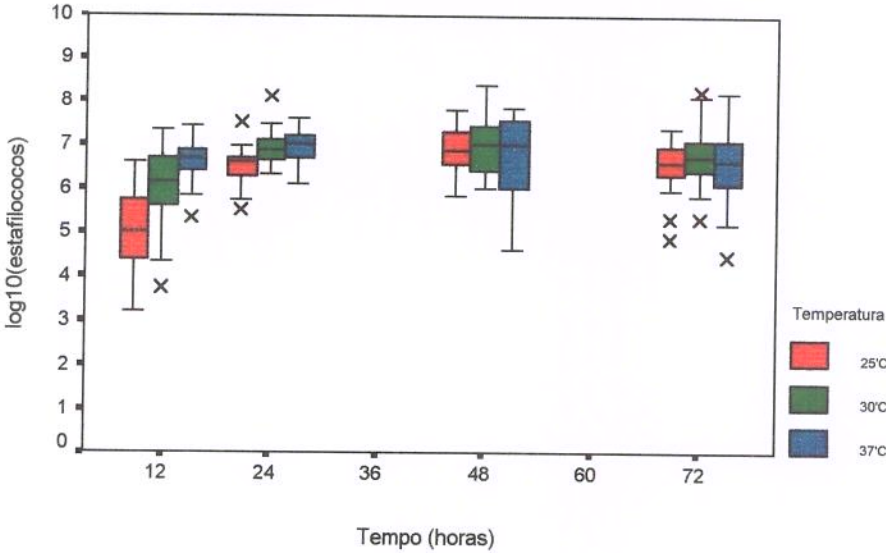


Gráfico 5 - Boxplot do logaritmo do número de estafilococos incubados a 25, 30 e 37°C segundo o tempo e a fonte, para o leite tratado e não tratado termicamente

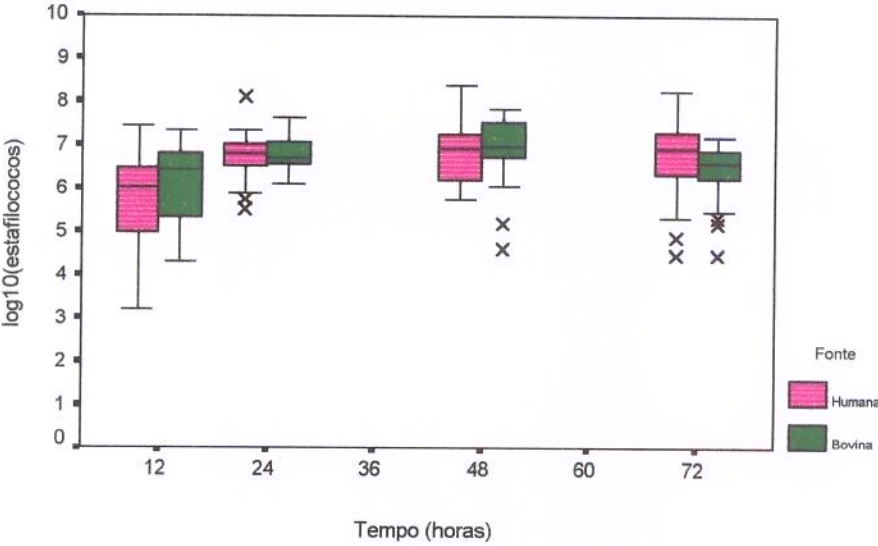


Gráfico 6 - Boxplot do logaritmo do número de estafilococos segundo o tempo e a temperatura, para o presunto tratado e não tratado termicamente

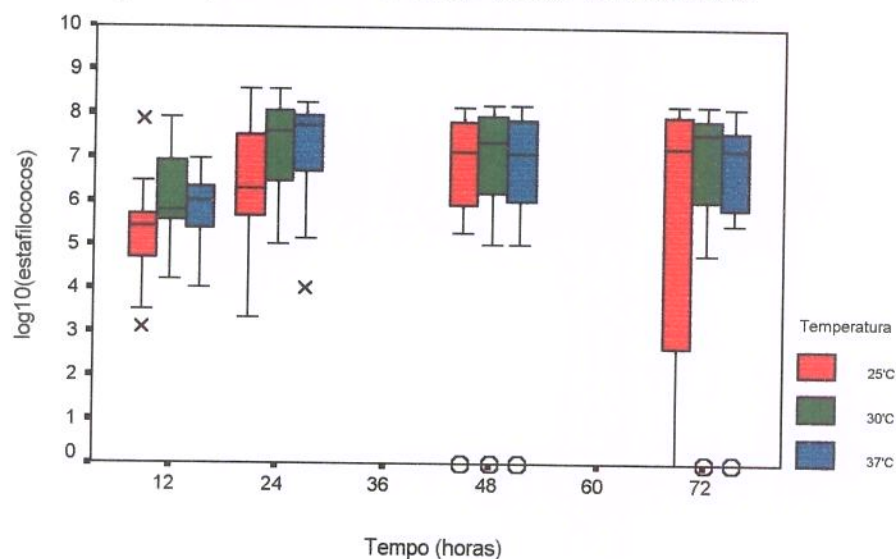


Gráfico 7 - Boxplot do logaritmo do número de estafilococos incubados a 25, 30 e 37°C segundo o tempo e o tipo de flora, para o presunto

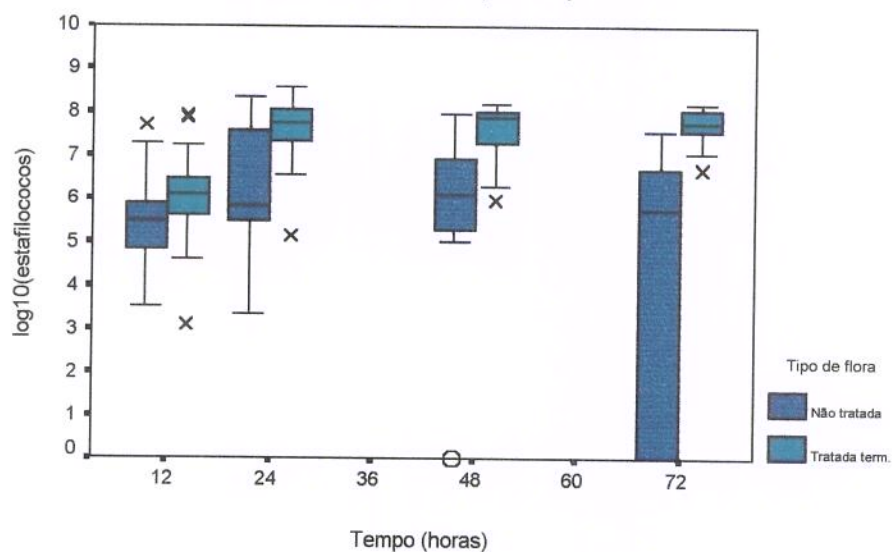


Gráfico 8 - Boxplot do logaritmo do número de estafilococos segundo o tempo e a temperatura, para o creme tratado e não tratado termicamente

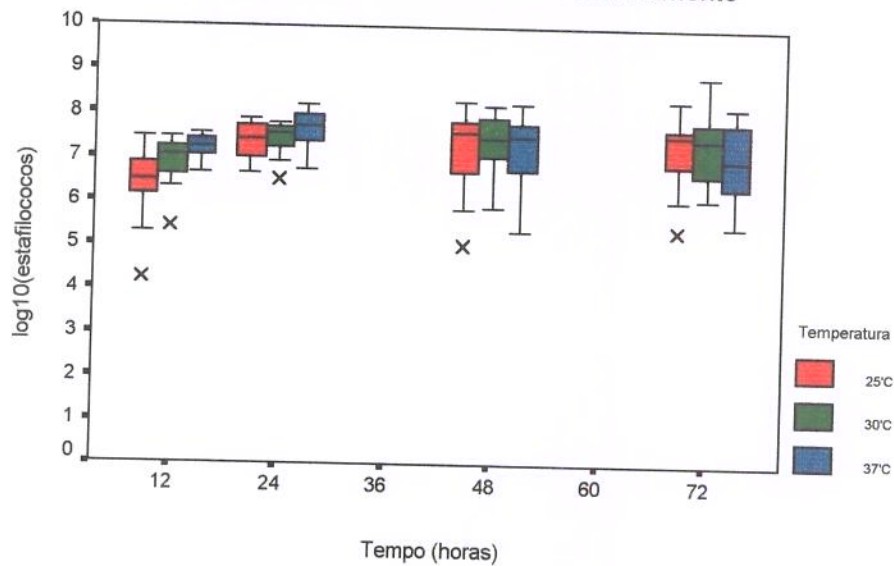
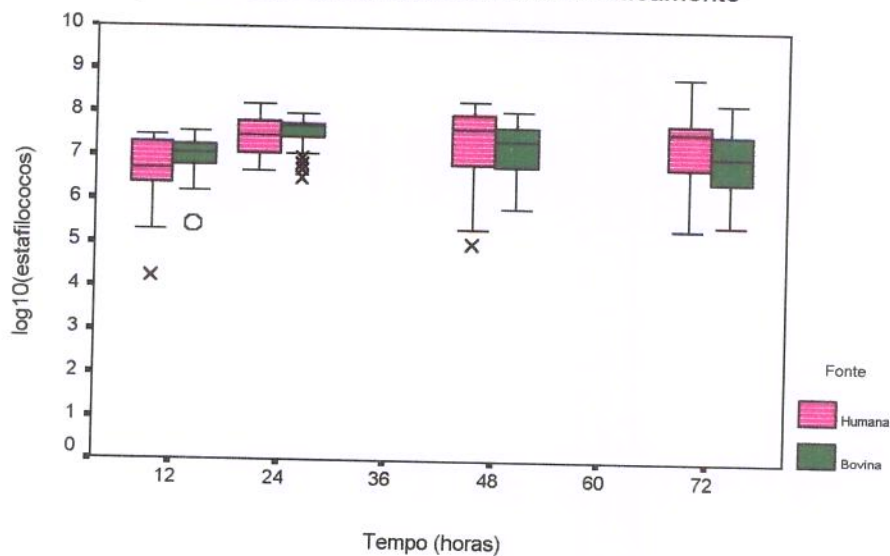


Gráfico 9 - Boxplot do logaritmo do número de estafilococos incubados a 25, 30 e 37°C segundo o tempo e a fonte, para o creme tratado e não tratado termicamente



4.5 – Estudo analítico dos dados

Inicialmente os dados foram analisados utilizando-se a técnica de análise de variância multivariada com medidas repetidas ao longo do tempo (12, 24, 48 e 72 horas), para cada um dos alimentos em separado.

Os resultados da análise estatística quanto ao desenvolvimento dos estafilococos inoculados para os diferentes alimentos estão inseridos nas Tabelas 13, 14 e 15. Pode-se verificar que a interação temperatura x tempo, fonte x tempo e tipo x tempo foram significativas ($p < 0,05$), quando o alimento em estudo foi o leite. Para as amostras de presunto cozido, pode-se observar que a interação significativa foi tipo x tempo; e para as amostras de creme de confeitaria houve significância nas interações temperatura x tempo e fonte x tempo.

A variável tempo de incubação, no desenvolvimento dos estafilococos em estudo, sempre aparece como sendo significativa nas interações com outras variáveis estudadas. Portanto, em uma segunda análise, a análise de variância a três vias, optou-se em estudar cada período de incubação para os diferentes alimentos, e assim verificar as possíveis significâncias em relação à temperatura, fonte do microrganismo e tipo de alimento (tratado e não tratado termicamente).

Verificou-se que o efeito principal, a temperatura foi significativo no desenvolvimento dos estafilococos após 12 e 24 horas de incubação, e a interação temperatura x fonte, sendo significativa, somente no período de 12 horas de incubação. Após 72 horas de incubação houve significância no efeito

principal tipo, isto é, diferença no desenvolvimento dos estafilococos entre as amostras de leite tratadas e não tratadas termicamente (Tabela 16).

Para as amostras de presunto cozido, o efeito principal temperatura foi significativo no período de 12 e 24 horas de incubação, após, não se observou significância estatística. Pode ser verificado também, que em 12 horas de incubação a interação fonte x tipo foi significativa. Em todos os tempos de incubação houve significância no tipo, amostras tratadas e não tratadas termicamente, de presunto cozido, no desenvolvimento dos estafilococos estudados (Tabela 17).

Para as amostras de creme de confeitaria, apenas no período de 12 horas de incubação, a interação temperatura x fonte foi significativa para o desenvolvimento dos estafilococos coagulase negativos (Tabela 18).

Tabela 13 - Análise de variância multivariada com medidas repetidas do número de estafilococos@ para leite

Fonte de variação	SQ ¹	Gl ²	F ³	P ⁴
Tempo	39,3	3	41,2	<0,001
Temperatura	12,3	2	5,9	0,005
Fonte	0,4	1	0,4	0,517
Tipo	<0,1	1	<0,1	0,851
Temperatura x tempo *	20,7	6	10,9	<0,001
Fonte x tempo *	5,9	3	6,2	<0,002
Tipo x tempo *	6,7	3	7,0	<0,001
Dentro dos grupos	49,9	48		
Resíduos	45,9	144		

@ Transformação logarítmica na base 10

* Interação significativa: efeitos principais são de pouco interesse; pode-se testar em cada tempo, a temperatura, a fonte (bovina,humana) e o tipo (amostras tratadas e não tratadas termicamente)

1 Soma de quadrados

2 Graus de liberdade

3 Estatística F de Snedecor

4 p-valor, nível descritivo

Tabela 14 – Análise de variância multivariada com medidas repetidas do número de estafilococos@ para presunto cozido

Fonte de variação	SQ	gl	F	p
Tempo	53,0	3	8,8	<0,001
Temperatura	22,6	2	2,0	0,143
Fonte	3,1	1	0,6	0,458
Tipo	238,8	1	42,9	<0,001
Temperatura x tempo	4,5	6	0,4	0,894
Fonte x tempo	1,0	3	0,2	0,921
Tipo x tempo *	79,4	3	13,2	<0,001
Dentro dos grupos	267,4	48		
Resíduos	289,6	144		

@ Transformação logarítmica na base 10

* Interação significativa: pode-se testar em cada tempo, o tipo e as outras fontes de variação

Tabela 15 - Análise de variância multivariada com medidas repetidas do número de estafilococos@ para creme de confeitaria

Fonte de variação	SQ	gl	F	p
Tempo	13,8	3	20,0	<0,001
Temperatura	2,2	2	1,2	0,322
Fonte	0,1	1	0,1	0,804
Tipo	0,9	1	0,9	0,337
Temperatura x tempo *	6,5	6	4,7	<0,001
Fonte x tempo *	3,4	3	4,9	<0,005
Tipo x tempo	0,6	3	0,9	0,465
Dentro dos grupos	46,4	48		
Resíduos	33,2	144		

@ Transformação logarítmica na base 10

* Interação significativa: pode-se testar em cada tempo, as outras fontes de variação

Tabela 16 – Análise de variância a 3 vias do número de estafilococos@ para leite, em cada tempo

Fonte de variação	SQ	gl	F	P
Tempo 12 horas (n=60)				
Temperatura	29,0	2	24,5	<0,001
Fonte	4,4	1	7,5	0,009
Tipo	2,0	1	3,4	0,070
Temperatura x fonte	4,5	2	3,8	0,029
Temperatura x tipo	0,4	2	0,3	0,716
Fonte x tipo	<0,1	1	<0,1	0,879
Resíduos	28,3	48		
Tempo 24 horas (n=60)				
Temperatura	2,5	2	6,7	<0,005
Fonte	0,1	1	0,4	0,532
Tipo	0,4	1	2,0	0,168
Temperatura x fonte	0,8	2	2,3	0,112
Temperatura x tipo	<0,1	2	0,1	0,872
Fonte x tipo	<0,1	1	0,2	0,637
Resíduos	8,8	48		
Tempo 48 horas (n=60)				
Temperatura	0,9	2	0,8	0,458
Fonte	0,1	1	0,2	0,696
Tipo	0,2	1	0,3	0,599
Temperatura x fonte	0,1	2	0,1	0,925
Temperatura x tipo	1,4	2	1,2	0,308
Fonte x tipo	1,1	1	1,9	0,180
Resíduos	27,8	48		
Tempo 72 horas (n=60)				
Temperatura	0,7	2	0,6	0,577
Fonte	1,8	1	2,8	0,102
Tipo	4,2	1	6,5	0,014
Temperatura x fonte	0,7	2	0,6	0,565
Temperatura x tipo	2,3	2	1,8	0,177
Fonte x tipo	0,3	1	0,5	0,494
Resíduos	30,9	48		

@ Transformação logarítmica na base 10

Tabela 17 – Análise de variância a 3 vias do número de estafilococos@ para presunto cozido, em cada tempo

Fonte de variação	SQ	gl	F	p
Tempo 12 horas (n=60)				
Temperatura	7,0	2	4,0	0,026
Fonte	<0,1	1	<0,1	0,879
Tipo	4,9	1	5,6	0,022
Temperatura x fonte	0,9	2	0,5	0,591
Temperatura x tipo	0,4	2	0,2	0,780
Fonte x tipo	4,2	1	4,7	0,035
Resíduos	42,4	48		
Tempo 24 horas (n=60)				
Temperatura	8,9	2	4,1	0,023
Fonte	0,9	1	0,8	0,368
Tipo	30,0	1	27,8	<0,001
Temperatura x fonte	0,9	2	0,4	0,671
Temperatura x tipo	0,5	2	0,2	0,805
Fonte x tipo	<0,1	1	<0,1	0,827
Resíduos	51,8	48		
Tempo 48 horas (n=60)				
Temperatura	2,7	2	0,4	0,700
Fonte	2,4	1	0,6	0,430
Tipo	80,3	1	21,5	<0,001
Temperatura x fonte	4,8	2	0,6	0,528
Temperatura x tipo	1,0	2	0,1	0,875
Fonte x tipo	0,6	1	0,2	0,681
Resíduos	179,0	48		
Tempo 72 horas (n=60)				
Temperatura	8,6	2	0,7	0,490
Fonte	0,8	1	0,1	0,711
Tipo	203,0	1	34,3	<0,001
Temperatura x fonte	0,8	2	0,1	0,937
Temperatura x tipo	7,8	2	0,7	0,523
Fonte x tipo	3,9	1	0,7	0,422
Resíduos	283,7	48		

@ Transformação logarítmica na base 10

Tabela 18 – Análise de variância a 3 vias do número de estafilococos@ para creme de confeitaria, em cada tempo

Fonte de variação	SQ	gl	F	p
Tempo 12 horas (n=60)				
Temperatura	6,9	2	15,8	<0,001
Fonte	1,3	1	6,0	0,018
Tipo	0,1	1	0,5	0,468
Temperatura x fonte	1,9	2	4,5	0,017
Temperatura x tipo	0,6	2	1,4	0,249
Fonte x tipo	0,8	1	3,6	0,065
Resíduos	10,4	48		
Tempo 24 horas (n=60)				
Temperatura	0,8	2	2,3	0,108
Fonte	0,1	1	0,3	0,579
Tipo	<0,1	1	0,1	0,715
Temperatura x fonte	<0,1	2	0,1	0,932
Temperatura x tipo	<0,1	2	0,1	0,915
Fonte x tipo	0,1	1	0,7	0,409
Resíduos	8,4	48		
Tempo 48 horas (n=60)				
Temperatura	0,1	2	0,1	0,903
Fonte	0,3	1	0,4	0,529
Tipo	1,3	1	1,9	0,171
Temperatura x fonte	0,2	2	0,2	0,857
Temperatura x tipo	0,2	2	0,2	0,838
Fonte x tipo	0,7	1	1,0	0,318
Resíduos	31,9	48		
Tempo 72 horas (n=60)				
Temperatura	0,9	2	0,8	0,471
Fonte	1,8	1	3,0	0,088
Tipo	0,1	1	0,1	0,718
Temperatura x fonte	0,2	2	0,1	0,866
Temperatura x tipo	<0,1	2	<0,1	0,989
Fonte x tipo	0,6	1	1,1	0,306
Resíduos	28,9	48		

@ Transformação logarítmica na base 10

4.6 – Produção e Detecção de Enterotoxinas nos Alimentos pelas Linhagens Estudadas

Para cada período e temperatura de incubação estudados foram retiradas amostras dos alimentos inoculados e não inoculados, com o objetivo de se averiguar a presença de enterotoxinas produzidas pelas linhagens testadas.

Foram comparados dois métodos para a detecção e identificação dos tipos de enterotoxinas estafilocócicas nos alimentos.

O método ELFA é de alto grau de sensibilidade em função de suas características, como previamente descrito no item 3.2.5, porém não identifica o tipo de enterotoxina presente, em função de utilizar um sistema polivalente.

O outro método, RPLA, é sensível e consegue identificar os diferentes tipos de enterotoxinas de A a D, mas apresenta problemas com relação a especificidade, uma vez que pode apresentar resultados duvidosos em alguns casos.

Das dez linhagens estudadas apenas *S.warneri* e *S.chromogenes* de origem bovina foram capazes de produzir enterotoxinas nos alimentos. E entre essas duas linhagens *S.chromogenes* foi capaz de produzir enterotoxinas em todas as amostras de alimentos analisadas.

Nas amostras de leite tratadas termicamente, quando *S.chromogenes* foi incubado à temperatura de 25°C por um período de 12 e 24

horas, não foi possível a detecção de enterotoxinas pelo método ELFA , mas após 48 horas de incubação, foi possível a detecção de enterotoxinas (Tabela 19). Para as amostras de presunto cozido e creme de confeitaria, em todos os tempos e temperaturas de incubação estudados detectou-se a presença de enterotoxinas, produzidas pela mesma linhagem. *S.chromogenes* se desenvolveu muito bem durante todo o período de estudo (Tabela 19).

A produção de enterotoxinas por *S.warneri*, somente foi detectada pelo método ELFA nas amostras de leite não tratadas termicamente, quando incubadas por 24 horas nas temperaturas de 25°C e 30°C (Tabela 19).

Tabela 19 – Detecção de enterotoxinas estafilocócicas produzidas nos alimentos pelas linhagens testadas, através do método ELFA

Temperatura °C	Tempo de Incubação (horas)	<i>S. chromogenes</i>						<i>S. warneri</i>					
		Amostras						Amostras					
		Leite		Presunto		Creme		Leite		Presunto		Creme	
		T*	N/T**	T	N/T	T	N/T	T	N/T	T	N/T	T	N/T
25	12	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	24	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
	48	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
	72	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
30	12	+	+	+	+	+	+	-		-	-	-	-
	24	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
	48	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
	72	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
37	12	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	24	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	48	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	72	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

* - amostras de alimentos tratadas termicamente

** – amostras de alimentos não tratadas termicamente

As amostras de alimentos, também foram submetidas à análise de detecção de enterotoxinas pelo método de RPLA. Os resultados diferiram em relação aos encontrados pelo método ELFA..

Os resultados obtidos pelo método de RPLA estão inseridos na Tabela 20. Apenas estão demonstradas, aquelas amostras, nas quais foram detectadas algum tipo de enterotoxina estafilocócica.

Observou-se também, a produção de enterotoxinas pelas linhagens de origem bovina *S.chromogenes* e *S.warneri*. Somente nas amostras de presunto cozido e creme de confeitaria, detectou-se a presença de enterotoxinas, nas amostras de leite, não se detectou nenhum tipo de enterotoxina produzida pelas linhagens.

Nas amostras de presunto, tratadas termicamente, incubadas por 12 horas à 30°C, e 24 horas à 37°C, verificou-se a presença de enterotoxinas do tipo C e D produzidas por *S. chromogenes*. A presença de enterotoxinas produzidas pela mesma linhagem, também foi verificada em amostras de creme de confeitaria não tratadas termicamente, após 12 e 24 horas de incubação à 30°C, detectou-se as enterotoxinas do tipo C e D, respectivamente, e após 24 horas à 37°C, a enterotoxina do tipo C.

S.warneri produziu enterotoxina do tipo D nas amostras de presunto tratadas termicamente e incubadas à 30 e 37°C por 24 horas, e enterotoxina do tipo C nas amostras não tratadas termicamente, e incubadas à 37°C por 24 horas.

Tabela 20 – Detecção de enterotoxinas estafilocócicas nos alimentos pelas linhagens testadas, através do método RPLA.

Linhagens	Amostras de Alimento	Tempo de Incubação (horas)	Temperatura de incubação °C	Tipo de Enterotoxina
S.chromogenes	Presunto (T) ¹	12	30	EEC e EED
		24	37	EED
	Creme (N/T) ²	12	30	EEC
		24	30	EED
		24	37	EEC
S.warneri	Presunto (T)	24	30	EED*
			37	
	Presunto (N/T)	24	37	EEC*

*- resultado duvidoso

1-amostras tratadas termicamente

2-amostras não tratadas termicamente

5 – DISCUSSÃO

Até o momento a importância dada as espécies coagulase negativas na epidemiologia dos surtos de intoxicação estafilocócica é insignificante, em relação às coagulase positivas, cujo envolvimento em intoxicações de origem alimentar é notoriamente comprovado em diversos episódios. O principal representante das espécies coagulase positivas é o *S. aureus*, que tem sido alvo de estudos nos últimos tempos, cujo destaque e importância é um fato inquestionável. A existência de dados na literatura, referentes a produção de enterotoxinas em meio de cultura laboratorial por cepas coagulase negativas (VERNOZY-ROZAND et al., 1996; OLIVEIRA & PEREIRA, 1995; HARVEY & GILMOUR, 1990 e BAUTISTA et al., 1988), e mesmo o seu envolvimento em surtos de intoxicação alimentar (CRASS and BERGDOLL, 1986; BRECKINRIDGE and BERGDOLL, 1971) reforçam a hipótese, da possibilidade de estafilococos coagulase negativos, serem capazes de produzir enterotoxinas em alimentos, tornando-se potencialmente problemático à saúde pública.

O teste bioquímico de fundamental importância na seleção das linhagens estudadas, foi o de produção da enzima coagulase, pois a partir desse dado é que foi comprovado, se as linhagens enterotoxigênicas que seriam utilizadas no experimento, realmente, não possuíam a capacidade de produzir esta enzima.

Turner and Schwartz (1958) propuseram que qualquer formação de coágulo poderia ser considerada como uma reação positiva. SPERBER & TATINI (1975) acreditavam que, quase todas as linhagens de *S. aureus*

produziam uma reação de coagulação 4+, enquanto que a coagulação do plasma por outras bactérias seria usualmente 2+ ou 3+. Entretanto, a AOAC (Association of Official Analytical Chemists) preconiza que todos os graus de coagulação do plasma são resultados positivos, e a APHA (American Public Health Association) considera uma reação 3+ ou 4+ como positiva. Por outro lado, o BAM (Bacteriological Analytical Manual), propõe que somente 4+ deve ser positiva. Uma vez que, os procedimentos analíticos, utilizados pela AOAC (1990), APHA (1990) e BAM (1992) são mundialmente aceitos por microbiólogos de alimentos, e para que dúvidas não pairassem quanto ao resultado obtido, somente foram consideradas como linhagens coagulase negativas, àqueles em que não se observou qualquer formação de coágulo após 24 horas de incubação a 37°C. Ressalvando-se que, a reação foi acompanhada em intervalos de uma hora, durante as seis primeiras horas de incubação.

Em relação às outras características bioquímicas verificadas entre as linhagens identificadas, observou-se que para as duas linhagens de *S.xylosus*, o resultado do teste de Tnase foi positivo, divergindo em relação aos dados existentes na literatura (Tabela 01). Comportamento semelhante foi apresentado por uma das linhagens de *S.epidermidis*, cujo resultado positivo para a TNase é contrário ao descrito.

Assim, a partir de dez linhagens de estafilococos coagulase negativas isoladas de leite cru de bovino e portadores humanos, confirmou-se a produção de enterotoxinas em meio de cultura laboratorial, utilizando-se o método de RPLA para a detecção (Tabela 02).

Os estafilococos se desenvolvem em vários tipos de alimentos quando naturalmente presentes ou quando inoculados. E dentre esses

alimentos, destacam-se o leite, o presunto e o creme. Os dois últimos, pela sua intensa manipulação humana, têm sido os responsáveis por casos de intoxicação estafilocócica, quando contaminados por enterotoxinas e ingeridos (OLIVEIRA, 1995; PEREIRA et al., 1994; PEREIRA, 1990).

Portanto, os alimentos escolhidos para o estudo do comportamento das linhagens coagulase negativas foram o leite em pó, o presunto cozido adquirido em supermercado próximo a região e o creme de confeitaria produzido no próprio laboratório.

Como demonstrado nas Tabelas 04 a 09, o inóculo de estafilococos coagulase negativos se desenvolveram nos alimentos analisados, com um grande aumento da população, nas primeiras 12 horas de incubação, dados esses compatíveis ao esperado, com exceção ao crescimento à 25°C, que continuou pelo próximo período.

Nas amostras de leite em pó desnatado e creme de confeitaria, o desenvolvimento das linhagens coagulase negativas de origem bovina e de humanos foi semelhante, tanto nas amostras estéreis, quanto nas não estéreis. Portanto, o tratamento térmico das amostras, não alterou o desenvolvimento dos microrganismos em estudo, já que o número de contaminantes iniciais presentes era muito baixo (Tabela 03).

Já nas amostras de presunto cozido, o desenvolvimento diferencial em relação as amostras estéreis e não estéreis foi notório, conforme apresentado nas Tabelas 06 e 07. Os estafilococos coagulase negativos demonstraram um bom desenvolvimento nos períodos de 12 e 24 horas de incubação, com declínio e ausência de crescimento nos períodos subsequentes

de 48 e 72 horas, nas amostras de presunto cozido sem tratamento térmico, onde o número inicial de contaminantes (Tabela 03) era maior que o inóculo de estafilococos coagulase negativos .

Esse fato demonstra que a maioria das linhagens de estafilococos coagulase negativas, experimentalmente inoculadas nos alimentos, apresentavam uma baixa capacidade competitiva, quando em desvantagem numérica.

Outro fator importante a ser questionado é o declínio de nutrientes disponíveis após um certo período de incubação, limitando o desenvolvimento de algumas das linhagens teste, quando inoculadas nas amostras de presunto sem tratamento térmico.

Cabe ainda discutir, o comportamento dessas linhagens em diferentes temperaturas de incubação.

De acordo com os Gráficos 06 e 08, verifica-se que 37°C foi a melhor temperatura de desenvolvimento, quando as linhagens de estafilococos coagulase negativas foram inoculadas em amostras de leite e creme de confeitaria no período de 12 horas de incubação. Após esse período, não houve diferença significativa entre as outras temperaturas utilizadas no experimento. Enquanto que, para as amostras de presunto, a melhor temperatura observada para o desenvolvimento das linhagens, no mesmo período de incubação foi 37°C, e após 24 horas, 30 e 37°C, em relação aos tempos subsequentes não foi verificada diferença significativa (Figura 06).

A temperatura de 25°C, mesmo não sendo a ideal para os estafilococos coagulase negativos inoculados, estes conseguiram desenvolver

em todos os períodos de incubação, nas amostras de presunto cozido, creme de confeitaria e leite (Gráficos 04, 06 e 08).

A interferência da flora pré-existente no alimento foi tão significativa, que para as amostras de presunto cozido, em todos os períodos de incubação, os estafilococos coagulase negativos inoculados se desenvolveram muito melhor nas amostras tratadas, em relação as não tratadas termicamente (Gráfico 7).

Um outro objetivo do trabalho foi verificar se haveria alguma diferença no desenvolvimento das linhagens coagulase negativas em relação a fonte da qual foram isoladas, isto é, bovina ou humana.

Quando estas linhagens foram inoculadas em amostras de presunto cozido, não se verificou nenhuma diferença significativa, porém em relação ao leite e creme de confeitaria, houve uma diferença significativa, novamente, no período de 12 horas de incubação (Gráficos 05 e 09). As linhagens de origem bovina, desenvolveram-se melhor que as de origem humana.

O melhor desenvolvimento nas amostras de leite e creme de confeitaria, pelas linhagens coagulase negativas de origem bovina, em relação às de origem humana, pode ser devido a seu habitat inicial, pois, primeiramente foram isoladas de leite cru de bovino. Enquanto, as de origem humana tiveram que se adaptar a um outro tipo de ambiente. As linhagens de origem bovina, supostamente, já estariam adaptadas em leite, e portanto, conseguiram iniciar um melhor crescimento. Após esse período, não se observou nenhuma diferença significativa entre as linhagens, talvez pelo fato de sua adaptação.

A escassez de trabalhos que tratam da importância de estafilococos coagulase negativos em alimentos, o seu comportamento em diferentes

alimentos, temperatura ideal no seu desenvolvimento, capacidade de produção de enterotoxinas por linhagens enterotoxigênicas coagulase negativas, limita o conteúdo da discussão em relação a comparação com outros alimentos.

A única citação em literatura encontrada, trata sobre o crescimento e produção de enterotoxinas por *S.warneri* CCRC 12929 e *S.haemolyticus* CCRC 12923 em leite bovino e caprino (LI & CHENG, 1997), onde os pesquisadores verificaram a produção de enterotoxinas do tipo A e D por *S.warneri* e enterotoxina D produzida por *S.haemolyticus*, sendo que a maior quantidade de enterotoxina produzida foi verificada em leite caprino. Observaram que a temperatura ótima de crescimento, e produção de enterotoxinas no leite foi 37°C.

Das dez linhagens utilizadas neste trabalho, somente duas foram capazes de produzir enterotoxinas nos alimentos, e as duas linhagens são de origem bovina. Durante todo o período experimental *S.chromogenes* demonstrou um ótimo desempenho em todas as temperaturas estudadas e alimentos analisados. Este fato mostra que, além da necessidade de nutrientes essenciais para a produção de enterotoxinas em alimentos, o microrganismo precisa ser um bom competidor.

Poderia então ser questionado, o porquê das linhagens consideradas não competidoras, não serem capazes de produzir enterotoxinas nas amostras de alimentos tratadas termicamente, considerando que as concorrentes foram eliminadas.

É difícil encontrar uma resposta satisfatória, poder-se-ia dizer que, pelo fato das amostras terem sido tratadas termicamente haveria a possibilidade da formação de complexos ou degradação de nutrientes e as linhagens apesar

de se desenvolverem, não produziram enterotoxinas; principalmente, àquelas oriundas de humanos, pois se encontravam em um meio diferente do original.

Um outro fator que deve ser abordado são as metodologias utilizadas na detecção das enterotoxinas.

O método em que se baseia o ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) é semelhante ao método de ELISA (Enzyme Linked Imuno Assay). Portanto, o método ELFA, como o ELISA são bastante sensíveis, uma vez que, o método de ELISA possui uma sensibilidade de 0,5 a 1,0 ng de enterotoxinas por grama de alimento (Bergdoll, 1990), embora sendo um método sensível, o ELFA não permite distinguir entre os diferentes tipos de enterotoxinas estafilocócicas conhecidos, assim o método de RPLA foi utilizado com o intuito de se caracterizar o tipo de enterotoxina.

A técnica de RPLA é considerada também, simples e sensível, 0,25 ng/mL, porém, pode apresentar reações inespecíficas. Segundo PEREIRA (1996), podem ser evidenciadas no ensaio, reações cruzadas com componentes do alimento interagindo com o látex sensibilizado com anti-enterotoxina do tipo C.

O uso da técnica de RPLA na detecção de enterotoxinas produzidas por *S.warneri*, em amostras de presunto, diferiram dos resultados esperados, pois, foi verificado a produção de enterotoxinas do tipo A, em meio de cultura laboratorial (Tabela 02), e nas amostras de presunto, as enterotoxinas do tipo C e D (Tabela 20). O resultado encontrado é duvidoso em relação ao tipo de enterotoxina produzida por *S. warneri*, mas não que essa linhagem não possua capacidade enterotoxigênica em alimentos, pois, pelo método ELFA, verificou-se

a presença de algum tipo de enterotoxina produzida por essa linhagem em leite, mas o mesmo não sendo observado nas amostras de presunto cozido e creme de confeitaria (Tabela 20)

S.chromogenes mostrou ser um excelente produtor de enterotoxinas, pois, praticamente em todas as amostras de alimentos analisadas o resultado foi positivo, quando a detecção foi realizada através do método ELFA, exceto nas amostras de leite tratadas termicamente e incubadas por 12 e 24 horas, à 25°C. Nessas amostras, somente foi detectada a presença de enterotoxinas após 48 horas de incubação (Tabela 19).

Com base nos resultados obtidos das contagens, observa-se que o número de estafilococos, para as amostras de presunto cozido, poderia ter sofrido variações mínimas na concentração do inóculo, em relação às amostras de leite e creme de confeitaria, no mesmo período de incubação (Tabelas 04, 06 e 08). Em relação as amostras de leite, possivelmente, o número inicial de microrganismos inoculados foi menor, e somado a uma temperatura abaixo da ótima poderia se encontrar a explicação para baixa produção de enterotoxinas, não detectadas pelo equipamento, pois a leitura do RFV encontrava-se no limite entre positivo ou negativo.

Quando se utilizou o método de RPLA (Tabela 20), para verificar a presença de enterotoxinas produzidas por *S.chromogenes*, somente nas amostras de presunto cozido e creme de confeitaria é que foram detectadas as enterotoxinas do tipo C e D, as mesmas produzidas em condições de cultivo laboratorial.

Resultados semelhantes aos obtidos pela técnica de RPLA, na detecção de enterotoxinas, produzidas pelas linhagens coagulase negativas *S.warneri* e *S.chromogenes*, demonstram a limitação do método, uma vez que, pelo método ELFA, em quase todas as amostras de alimentos analisadas foi detectada a presença de algum tipo de enterotoxina produzida por *S.chromogenes*, o mesmo não ocorrendo quando da utilização do método de RPLA., o que caracteriza deficiência nesta metodologia.

Face aos resultados obtidos neste trabalho, torna-se claro a necessidade de uma maior atenção, quanto ao comportamento de linhagens atípicas de estafilococos, bem como um melhor estudo do seu desenvolvimento em presença de outros nutrientes e condições ambientais, com a finalidade de se constatar a real capacidade de produção, de pelo menos alguma das enterotoxinas conhecidas.

Por outro lado, deve-se levar em consideração, a provável existência de outras substâncias com ação emética produzidas por estes microrganismos. Segundo opiniões pessoais do eminente pesquisador Dr. Merlin S. Bergdoll, na área de toxinas estafilocócicas, embora estas metodologias sejam bastante sensíveis, a única maneira de se constatar a enteropatogenicidade de uma linhagem, sem dúvida seria a constatação da síndrome, porém, esta é uma real dificuldade, pela carência de métodos que possam ser utilizados com esta finalidade.

6 - CONCLUSÕES

A partir dos resultados discutidos neste trabalho cabem as seguintes conclusões:

- 1 – Com a comprovação de que linhagens de estafilococos coagulase negativos, *S.chromogenes* e *S.warneri* possuem a capacidade de se desenvolver e produzir enterotoxinas em alimentos, há a necessidade de uma reavaliação nas metodologias normalmente utilizadas como rotina em análise de estafilococos enterotoxigênicos em laboratórios de microbiologia de alimentos.
- 2 – Das duas metodologias utilizadas na detecção de enterotoxinas estafilocócicas, o Vidas-Set foi mais eficiente em relação ao SET-RPLA, além da rapidez dos resultados (80 minutos).
- 3 – Linhagens de estafilococos coagulase negativas de origem animal demonstraram possuir uma maior capacidade de adaptação em alimentos, e conseqüentemente produzir enterotoxinas.
- 4 – Dos alimentos utilizados (leite, presunto cozido e creme de confeitaria), notou-se uma diferença significativa para o alimento leite e creme de confeitaria, no desenvolvimento das linhagens de origem bovina no período de 12 horas de incubação.

- 5 – A melhor temperatura observada no desenvolvimento e produção de enterotoxinas nos alimentos, foi 37°C.
- 6 – *Estafilococos* coagulase negativos provaram ser incapazes de competir frente a microbiota pré-existente nos alimentos analisados.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - ADESIYUN, A. A.; TATINI, S. R.; HOOVER, D. G. Production of enterotoxin (s) by *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.9, p.487-495, 1984.
- 02 - SPECK, M. L. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 2.ed.Washington, D. C: American Public Health Association, 1984, 914p.
- 03 - AVENA, R. M.; BERGDOLL, M. S. Purification and some physicochemical properties of enterotoxins C, *Staphylococcus aureus* strain 361. **Biochemistry**, New York, v.6, p.1474-1480, 1967.
- 04 - BAIRD-PARKER, A. C. The staphylococci: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**, New York, n.19, p.15-85, 1990. supplement.
- 05 - BARBER, L.E.; DEIBEL, R. H. Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage. **Applied Microbiology**, Washington, v.24, p.891-898, 1972.
- 06 - BAUTISTA, L.; GAYA, P.; MEDINA, M.. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.2, p.566-569, 1988.

- 07 - BEERY, J. T.; TAYLOR, S. L.; SCHLUNZ, L. R. Effects of staphylococcal enterotoxin A on the rat gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**, Washington, v.44, p.234-240, 1984.
- 08 – BENNETT, R. W.; YETARION, M.; SMITH, W.; COLES, C. M; SASSAMAN, M.; mc CLURE, F. D. Staphylococcus aureus identificacion, characteristics and enterotoxigenicity. **Journal of Food Science**, Chicago, v.51, p.1337–1339, 1986.
- 09 – BERGDOLL, M.S. Analytical methods for Staphylococcus aureus. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.10, p.91–100, 1990.
- 10 - BERGDOLL, M. S.. Enterotoxins. In: EASMAN, C. F. S.; ADLAM, C. (Ed). **Staphylococci and Staphylococcal Infections**. Academic Press, London: 1983. v.2, p. 559-598.
- 11 – BERGDOLL, M. S. Staphylococcal Intoxications. In: RIEMAN, H; BRYAN, F. L. **Food borne infections and intoxications**. New York: Academic Press, 1979. p. 443-494.
- 12 –BERGDOLL, M. S. The enterotoxins. In: COHEN, J. O. (Ed). **The Staphylococci**. Toronto: Wiley - Interscience, 1972. p. 301-331.
- 13 - BERGDOLL, M. S.; BORJA, C. R.; ROBBINS, R. N.; WEISS, K. F. Identification of enterotoxins E. **Infection and Immunity**, Washington, v.4, p.593-595, 1971.

- 14 - BERGDOLL, M.S.; BORJA, C. R.; AVENA, R.M. Identification of a new enterotoxin C. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.90, p.1481-1485, 1965.
- 15 - BERGDOLL, M. S.; SURGALLA, M. J.; DACK, G. M. Staphylococcal enterotoxin: Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxina neutralizing property. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.83, p.334-338, 1959.
- 16 - 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. **Chemistry and Immunology**, Basel, v.55, p.1 - 35, 1992.
- 17 - BRECKINRIDGE, L. C.; BERGDOLL, M. S.. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin-producing *Staphylococcus*. **Medicine Intelligence** , Baltimore, v.284, n.10, p.541-543, 1971.
- 18 - BRUNNER, K. G.; WONG, A. C.. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in mushrooms. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, n.3, p.700-703, 1992.
- 19 - BRYANT, R.; JARVIS, J.; GUIBERT, G.. Selective enterotoxin production by a *Staphylococcus aureus* strain implicated in a foodborne outbreak. **Journal of Food Protection**, Ames, v.51, n.2, p.130-131, 1988.

- 20 – BURRIEL, A. R. Isolation of coagulase-negative staphylococci from the milk and environment of sheep. **Journal of Dairy Research**, New York, v.65, p.139–142, 1998.
- 21 - CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. S.. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.21, n.4, p.320-323, 1990.
- 22 - CASMAN, E. P.; BENNETT, R. W.; DORSEY, A. E.. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.94, p.1875-1882, 1967.
- 23 - CASMAN, E. P.; BENNETT, W. Detection of Staphylococcal enterotoxin in food. **Applied Microbiology**, Washington, v.13, p.181-189, 1965.
- 24 - CASMAN, E. P.; BERGDOL, M. S.; ROBINSON, J. Designation of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.85, p.715-716, 1963.
- 25 - CASMAN, E. P. Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.79, p.849-856, 1960.
- 26 – CHANG, T. C.; HUANG, S. H. Evaluation of coagulase activity and protein A production for the identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.8, p.858–862, 1995.

- 27 - CRASS, B. A.; BERGDOLL, M. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washinton, v.23, p.43-45, 1986.
- 28 - CERQUEIRA-CAMPOS, M. L.; FURLANETO, S. M. P.; IARIA, S. T.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning outbreaks in São Paulo (Brazil). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.24, n.4, p.261-264, 1993.
- 29 - CHESNEAU, O. MORVAN, A.; GRIMONT, F.; LABISCHINSKI, H.; EL SOLH, N. *Staphylococcus pasteurii* sp. nov. isolated from human, animal and food specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.237-244, 1993.
- 30 - DE BUYSER, M. L.; DILASSER, F.; HUMMEL, R.; BERGDOLL, M. S.. Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production by staphylococci isolated from goat's milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 5, p.301-309, 1987.
- 31 - DEVRIESE, L. A; NZUAMBE, D; GODARD, C. Identification and characteristics of staphylococci of lesins and normal skin of horses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.10, p.269-277, 1984.
- 32 - DEVRIESE, L. A.; SCHLEIFER, K. H.; ADEGAKE, G. O. Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.58, p.45-55, 1985.

- 33 – DUNN, O. J.; CLARK, V. A. **Applied statistics analysis of variance and regression**. New York: John Wiley, 1987.
- 34 - EL-DAIROUTY, K. R.. Staphylococcal intoxication traced to non-fat dried milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, p.901-902, 1989.
- 35 - EVENSON, M. L.; HINDS, M. W.; BERNSTEIN, R. S.; BERGDOLL, M. S.. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.7, p.311-316, 1988.
- 36 - FDA (Food and Drug Administration) **Bacteriological analytical manual**, v. 6, p.77-88, 1984.
- 37 – FOSTER, T. J.; MCDEVITT, D. Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*. Their possible roles in virulence. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.118, p.199–206, 1994.
- 38 – FORSGREN, A.. Significance of protein A production by staphylococci. **Infection and Immunity**, Washington, v.2, p.672–673, 1970.
- 39- FREITAS, M. A. Q.; MAGALHÃES, H.. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus*, isolados de vacas com mastite. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.21, n.4, p.315-319, 1990.

- 40 - FUKUDA, S.; TOKUNA, H.; OGAWA, H.; SASAKI, M.; KISHIMOTO, T.; KAWANO, J.; SHIMIZU, A.; KIMURA, S. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* strains isolated from dogs. **Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**, Stuttgart, v.258, p.360-367, 1984.
- 41 - FUJIKAWA, H.; IGARASHI, H. Rapid latex agglutination test for detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p.2345-2348, 1988.
- 42 - GALESLOOT, E.; STADHOUDERS, J. The microbiology of spray-dried milk products with special reference to *S. aureus* and *Salmonellae*. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Wageningen, v.22, p.158-172, 1968.
- 43 - GARCIA, M. L.; FRANCISCO, J. J.; MORENO, B. Nasal carriage of *Staphylococcus* species by food handlers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v,3, p.99-108, 1986.
- 44 - GARCIA, M. C; OTERO, A.; GARCIA, M. L; GARCIA, M. R.; MORENO, B. Species identification of staphylococci and Micrococci isolated from ewes' milk cheeses. **Journal of Dairy Reserch**, London, v.55, p.269-276, 1988.

- 45 - GASZEWSKA-MASTALARZ, A.; ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, T. Rapid identification of *Staphylococcus saprophyticus* using an oligonucleotide probe complementary to 16 S rRNA. **System Applied Microbiology**, New York, v.18, p.123-126, 1995.
- 46 – GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S.; MIGUEL, M.; MIGUEL, O. Prevenção do controle das toxinfecções de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.7, n.27, p.6–11, 1993.
- 47 - GILMOUR, A; HARVEY, J. Staphylococci in milk and milk products. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, p.147 S - 166S, 1990, supplement.
- 48 – GÖCKLER, L.; NOTERMANS, S.; KRÄMER, J. Production of enterotoxins and thermonuclease by *Staphylococcus aureus* in cooked egg-noodles. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.6, p.127–139, 1988.
- 49 - GOEPFER, J. M.; KIM, H. U. Behavior of selected food borne pathogens in raw ground beef. **Journal of Milk and Food Technology**, Indiana, v.38, p.449-452, 1975.
- 50 – GOH, S. H.; SANTUCCI, Z.; KLOOS, W. E; FALTYN, M.; GEORGE, C. G; DRIEDGEN, D.; HEMMINGSEN, S. M. Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene Identification method and reverse checkerboard hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.12, p.3116–3121, 1997.

- 51 - GOLLEDGE, C. L. *Staphylococcus saprophyticus* bacteremia. **Journal of Infection Disease**, Ames, v.157, p.215-219, 1988.
- 52 - GUITIERREZ, L. M.; MENES, I.; GARCIA, M. C.; MORENO, B.; BERGDOLL, M. S. Characterization and enterotoxigenicity of staphylococci isolated from mastitic ovine milk in Spain. **Journal of Food Protection**, Ames, v.45, p.1282-1286, 1982.
- 53 - HÁJEK, V. W. L.; SCLEIFER, K. H.; ZITZELSBERGER, W.; KROPPESTEDT, R. M.; KOCUR, M. *Staphylococcus muscae*, a new species isolated from flies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.97-101, 1992.
- 54 - HÁJEK, V.; MEUGNIER, H. BES, M.; BRUN, Y.; FIEDLER, F.; CHMELA, Z.; LASNE, Y.; FLEURETTE, J.; FRENEY, *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* subsp. nov., isolated from bovine nostrils. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.46, p.792-796, 1996.
- 55 - HALPIN - DOHNALEK, M. I.; MARTH, E. H. Fate of *Staphylococcus aureus* in whipped butter. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n.12, p.863-866, 1989.
- 56 - HALPIN-DOHNALEK, M. I.; MARTH, E. H. Growth and production of enterotoxin A by *Staphylococcus aureus* in cream. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.72, p.2266-2275, 1989.

- 57 - HARDT-ENGLISH, P.; YORK, G.; STIER, R.; COCOTAS, P. Staphylococcal food poisoning outbreaks caused by canned mushrooms from China. **Food Techonology**, Chicago, v.22, p.74-78, 1990.
- 58 - HARRIS, T. O.; BETLEY, M. J. Biological activities of staphylococcal enterotoxin type A mutants with N-terminal substitution. **Infection and Immunity** , Washington, v.63, p.2133-2140, 1995.
- 59 - HARVEY, J.; GILMOUR, A. Isolation and identification of staphylococci from milk powders produced in Northern Irland. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v.68, p.433-438, 1990.
- 60 - HARVEY, J.; GILMOUR, A. Isolation and characterization of staphylococci from goats milk produced in Northern Ireland. **Letters in Applied Microbiology**, Backwell , v.7, p.79-82, 1988.
- 61 - HARVEY, J.; GILMOUR, A.. Aplication of current methods for isolation and identification of staphylococci in raw bovine milk. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v.59, p.207-221, 1985.
- 62 – HIROOKA, E. Y.; SALZBERG, S. P.C.; BERGDOLL, M.S . Production of staphylococcal enterotoxin A and Thermonuclease in cream pies. **Journal of Food Protection**, Ames, v.50, n.11, p.952–955, 1987.
- 63 - HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

- 64 - HOVELIUS, B.; MARDH, P. A. *Staphylococcus saprophyticus* as a common cause of urinary tract infection. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v.6, p.328-337, 1984.
- 65 - IKEJIMA, T.; OKUSAWA, S.; van der MEER, J. W. M.; DINARELLO, C. A. Induction by toxic-shock syndrome toxin-1 of a circulating tumor necrosis factor-like substance in rabbits and of immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 from human mononuclear cells. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.158, p.1017-1025, 1988.
- 66 - JAULHAC, B.; BES, M.; BORNSTEIN, N.; PIÉMONT, Y.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Syntetic Dna probes for detection of genes for enterotoxins A, B, C, D, E and for TSST-1 in staphylococcal strains. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v.72, p. 386-392, 1992.
- 67 - JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis** .Englewood Cliffs: Pentice Hall, 1982.
- 68 - KLOOS, W. E. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.34, p. 559-592, 1980.
- 69 - KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Genus IV *Staphylococcus* In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. SNEATH, P. H. A. (Ed), Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v.2, p.999-1035.

- 70 – LAMBERT, L. H; MITCHELL, K; ROSSELLÓ-MORA, R. A.; DEL CUETO, C.; DODGE, D. E; ORKAND, P.; CANO, R. J. .*Staphylococcus succinus* sp. Nov., isolated from Dominican amber. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.48, p.511-518, 1998.
- 71 - LEE, A. C. M.; ROBBINS, R. N.; REISER, R. F. Isolation of specific and common antibodies to staphylococcal enterotoxins B, C and C₂. **Infection and Immunity** , Washington, v. 27, p.431-434, 1980.
- 72 – LI, F.C; CHENG, C. C. Growth and enterotoxins production by coagulase-negative *Staphylococcus* strains *Staphylococcus warneri* CCRC 12929 and *S. haemolyticus* CCRC 12923 in cow milk and goat milk. **Food-Science, Taiwan**, v.24, n.1, p.120-128, 1997.
- 73 - MARIN, M. E.; LA ROSA, M. C.; CORNEJO, I.. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* strains isolated from Spanish dry-cured hams. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n.3, p.1067 - 1069, 1992.
- 74 – MARTIN, S. T.; BEELMAN, R. B. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in fresh packaged mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.8, p.819–826, 1996.
- 75 - MARRACK, P.; KAPPLER, J.. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science**, Washington, v.248, p.705-711, 1990.

- 76 – MEYRAND, A.; BOUTRAND-LOEI, S.; RAY-GUENIOT, S.; MAZUY, C.; GASPARD, C. E; JAUBERT, G.; PERRIN, G.; LAPEYRE, C.; VERNOZY-ROZAND, C. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.85, p.537–544, 1988.
- 77 - MINOR, I. E.; MARTH, E. H.. Staphylococcal food poisoning. A review. Characteristics and isolation of staphylococci properties of enterotoxins and epidemiology of staphylococcal intoxications. **Journal of Nutrition and Dietetic**, New York, v.9, p.161-186, 1972.
- 78 - NANU, E.; NARAYAN, K. G.. Enterotoxin production by staphylococci isolated from pork kalab, salami and other sources by Elisa. **Journal of Food Science and Tecnology**, Mysore, v.29, n.4, p.383-384, 1992.
- 79 – NEUMAYR, L.; KRÄMER, J. Production of enterotoxin A and thermonuclease by *Staphylococcus aureus* in legumes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.3, p.225–233, 1989.
- 80 - NISKANEN, A.; KOIRANEM, L.. Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources. **Journal of Food Protection**, Ames, v.40, n.8, p.543-548, 1977.

- 81 - NG, D. L.K.; TAY, L.. Enterotoxigenic strains of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in drinks and ready-to-eat foods. **Food Microbiology**, London, v.10, p. 317-320, 1993.
- 82 – OKOJI, C. N.; INGLIS, B.; STEWART, P. R. Potential problems in the use of oligonucleotide probes for staphylococcal enterotoxin genes. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.74, p.637–644, 1993.
- 83 - OLIVEIRA, A. M. Estafilococos enterotoxigênicos: Pesquisa de cepas produtoras e baixo produtoras de enterotoxinas isoladas de leite cru de bovino. Campinas, 1995. 90p. Dissertação (Mestrado) – UNICAMP.
- 84 - OLSON, J. C.; CASMAN, E. P.; BAER, E. F.; STONE, J. E.. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* cultures isolated from acute cases of bovine mastitis. **Applied Microbiology**, Washington, v.20, n.4, p.605-607, 1970.
- 85 - OLSVIK, O.; FOSSUM, K.; BERDAL, B. Staphylococcal enterotoxin A, B and C produced by coagulase-negative strains within the family of *Micrococcaceae*. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica section B**, Kobenhavn, v.90, p.441-444, 1982.
- 86 - OLSVIK, O.; BERDAL, B. P.; FOSSUM, K.; OMLAND, T. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* related to the origin of the strains. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica section B** , Kobenhavn, v.89, p.423-426, 1981.

- 87 - ORDEN, J. A.; GOYACHE, J.; HERNÁNDEZ, J.; DOMÉNECH, A; SUÁREZ, G.; GÓMEZ-LÚCIA, E. Applicability of an immunoblot technique combined with a semiautomated electrophoresis system for detection of staphylococcal enterotoxins in food extracts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.4083-4085, 1992.
- 88 - PEREIRA, J. L.; SALZBERG, S. P.. Regulation of staphylococcal enterotoxins A and B produced by strain 5-6. **Journal of Food Protection**, Ames, v.45, p.1306-1309, 1982.
- 89 - PEREIRA, M. L. Staphylococci coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas e relato de um surto por espécie coagulase positiva. Campinas, 1996. 141p. (Doutorado)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
- 90 - PEREIRA, M. L.; LARA, M. A.; DIAS, R. S.; CARMO, L.S.. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo tipo "Minas". **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n.4, p.349-350, 1991.
- 91 - POLLEDO, J. J.; GARCIA, M. L.; MORENO, B.; MENES, I. Importance of foods handlers as a source of enterotoxigenic staphylococci. **Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene**, Stuttgart, p.364-373, 1985.
- 92 - RADDI, M. S. G.; LEITE, C. Q. F.; MENDONÇA, C. P.. *Staphylococcus aureus*: Portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 22, n.1, p.36-40, 1988.

- 93 – READ, R. B.; BRADSHAW, J. G. Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin B in Veronal Buffer. **Applied Microbiology**, Washington, v.14, p.130–134, 1966.
- 94 - REISER, R. F.; ROBBINS, R. N.; NOLETO, A. L.; KHOE, G. P.; BERGDOLL, M. S. Identification, purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C₃. **Infection and Immunity**, Washington, v.45, p.625-630, 1984.
- 95 - ROBBINS, R.; GOULD S.; BERGDOLL, M. S. Detection the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Applied Microbiology**, Washington, v.28, p.946–950, 1974.
- 96 - SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. L.; SOUZA, M. L. R. Intoxicação alimentar por queijo "Minas"contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista da Saúde Pública**, São Paulo, v.22, n.5, p.458-461, 1988.
- 97 - SCHLIEVERT, P. M.; SHANDS, K. N.; DAN, B. B. Identification and characterization of an enterotoxin from *Staphylococcus aureus* associated with toxic shock syndrome. **Journal Infection Disease**, Cambridge, v.143, p.509-516, 1981.
- 98 - SCHWABE, M.; NOTERMANS, S.; BOOT, R.; TATINI, S. R.; KRÄMER, J. Inactivation of staphylococcal enterotoxins by heat and reactivation by high pH treatment. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.10, p.33-42, 1990.

- 99 – SCOTT, W. J. Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30 °C.
Australian Journal of Biology and Science, East Melbourne, v.6,
p.549–563, 1953.
- 100 – SHIMIZU, A.; KAWANA, J.; TERANISHI, H.; HAZUE, S.; FUJINAMI,
T.; KIMURA, S.; SHUGIHARA, K. Isolation of *Staphylococcus* species
from the tonsils of healthy pigs and phage patterns of isolates. **Japanese
Journal of Veterinary Science**, Sapporo, v.49, p.703-709, 1987.
- 101 – SMITH, J. L.; BUCHANAN, R. L.; PALUMBO, S. A.. Effect of food
environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: A Review. **Journal
of Food Protection**, Ames, v.46, n.6, p.545-555, 1983.
- 102 – SNOPKOVÁ, S.; GÖTZ, F.; DOSKAR, J.; ROSYPAL, S. Pulsed-field gel
electrophoresis of the genomic restriction fragments of coagulase-
negative staphylococci. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.124,
p.131–140, 1994.
- 103 – STERSKY, A. K.; SZABO, R.; TODD, E. C.D; THACKER, C.; AKHTAR, M.
Staphylococcus aureus growth and thermostable nuclease and
enterotoxin production in canned salmon and sardines. **Journal of Food
Protection**, Ames, v.49, n. 6, p. 428–435, 1986.
- 104 – SU, C.; WONG, C. L. Identification and purification of a new staphylococcal
enterotoxin H. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington,
v.61, n.4, p.1438-1443, 1995.

- 105 - SURGALA, M. J.; BERGDOLL, M. S.; DACK, G. M. Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey - feeding test. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v.41, p.782-788, 1953.
- 106 - TANASUPAWAT, S.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; KOZAKI, M.; KOMAGATA, K. *Staphylococcus piscifermentans* sp nov. from fermented fish in Thailand. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.42, p.577-581, 1992.
- 107 - TATINI, S. R.; HOOVER, G. D.; LACHICA, F.. Methods for the isolation and enumeration of *Staphylococcus aureus*. In : SPECK, M. L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. New York: Academic Press, 1984. p. 411-429.
- 108 - TATINI, S. R. Thermal stability of enterotoxins in food. **Journal of Milk Technology**, Ames, v.39, p.432-438, 1976.
- 109 - TATINI, S. R. Influence of foods environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. **Journal of Milk Food Technology**, Indiana, v.36, n.11, p. 559-563, 1973.
- 110 - TRANTER, H. S. Foodborne illness: foodborne staphylococcal illness. **The Lancet**, London, v.27, p.1044-1046, 1990.
- 111 - TRANTER, H. S.; BREHM, R. D. Staphylococcal enterotoxins. **Journal of Applied Bacteriology.**, Washington, p.109S - 122S, 1990, supplement.

- 112 - UMOH, V. J.; ADESIYUN, A. A.; GOMWALK, N. E. Enterotoxin production by staphylococcal isolates from nigerian fermented milk products. **Journal of Food Protection**, Ames, v.51, n.7, p.534-537, 1988.
- 113 - VALLE, J.; GOMEZ-LUCIA, E.; PIRIZ, S.; GOYACHE, J.; ORDEN, J. A.; VADILLO, S. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.5, p.1323-1326, 1990.
- 114 - VARADARAJ, M. C.; RANGANATHAN, B.. Staphylococcal enterotoxins - methods of production and detection - A Review. **Indian Journal of Dairy Science**, Coimbatore, v.42, n.2, p.267-277, 1989.
- 115 - VERNZOY-ROZAND, C.; MAZEY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.30, p.271-280, 1996.
- 116 - VERNZOY-ROZAND, C.; MEYRAND, C. M; DELIGNETTE-MULLER, M. L.; JAUBERT, G; PERRINS, G.; LAPEYRE, C.; RICHARD, Y. Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goats' milk lactic cheeses. **Journal Dairy Research**, Denver, v.65, p.273-281, 1998.

- 117 - WEBSTER, J. A.; BANNERMAN, T. L.; HUBNER, R. J.; BALLARD, D. N.; COLE, E. M.; BRUCE, J. L.; FIEDLER, F.; SCHUBERT, K.; KLOOS, W. E. Identification of the *Staphylococcus sciuri* species group with Eco R1 fragments containing r RNA sequences and description of *Staphylococcus vitulus* sp nov. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p.454-460, 1994.
- 118 - WIENEKE, A. A. Enterotoxin production by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods and human beings. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v.73, p.255-262, 1974.
- 119 - ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J.; GASZEWSKA-MASTALARZ, A.; LIZ, B.; GAMIAN, A.; MORDARSKI, M. *Staphylococcus pulvereri* sp nov. isolated from human and animal specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p.169-172, 1995.