

STAPHYLOCOCCUS ENTEROTOXIGÊNICOS EM ALIMENTOS *IN NATURA* E PROCESSADOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL¹

Adelino da CUNHA NETO², Celiane Gomes Maia da SILVA³, Tânia Lúcia Montenegro STAMFORD^{3,*}

RESUMO

A contaminação de alimentos tem aumentado a cada ano, e atualmente representa um risco potencial para a saúde humana. *Staphylococcus* spp. foi isolado de alimentos processados e *in natura* e identificados através dos teste de Gram, catalase, coagulase, DNAase, termonuclease, acetoina (VP) e metabolismo de carboidratos (glicose, maltose e manitol). Foram selecionadas cepas com evidente reação de termonuclease, e realizada análise de enterotoxinas estafilocócicas, por teste imunoenzimático (VIDAS – Staph Enterotoxin – bioMerieux). Reação positiva de enterotoxinas estafilocócicas foram produzidas por *S. aureus* em camarão, queijo de coalho e macarrão e *S. intermedius* em peixe cozido e pasta de alho. Observou-se SCP (Estafilococos Coagulase Positiva) em queijo de coalho. Contaminação por *Staphylococcus* spp. ocorreu durante os estágios de produção ou na estocagem dos alimentos, produzindo toxinas. Conclui-se que estes alimentos representam risco à saúde humana se não forem observadas práticas adequadas de higiene no seu manuseio e no armazenamento.

Palavras-chave: termonuclease; DNAase; enterotoxinas; ensaio imunoenzimático; *S. aureus*; *S. intermedius*.

SUMMARY

ENTEROTOXIGENIC *STAPHYLOCOCCUS* IN NATURE AND PROCESSED FOODS IN STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL. Food contamination has increased in the recent years and actually represents a serious risk for human health. The occurrence of *Staphylococcus* spp. in nature and processed foods were identified by Gram test, catalase, coagulase, DNAase, acetoin production (AP) and by assays of carbohydrate metabolism (glucose, maltose and mannitol). Strains of *Staphylococcus* spp were selected by thermonuclease reaction and analysis of staphylococcal enterotoxins, detected by immunoenzymatic assays (VIDAS – Staph Enterotoxin – bio Merieux). Positive reaction for staphylococci enterotoxin was produced by *S. aureus* in shrimps; farmhouse cheese and macaroni mass; *S. intermedius* in cooked fish and garlic paste. SCP (Staphylococci Coagulase Positive) were observed in farmhouse cheese. Contamination by *Staphylococcus* spp occurred during food production and storage. We can conclude that practices of hygiene need to be observed during food production and storage.

Keywords: hermonuclease; DNAase; enterotoxins; immunoenzymetic assays; *S. aureus*; *S. intermedius*.

1 – INTRODUÇÃO

Os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos, que podem levar ao desenvolvimento de doenças, afetando a saúde humana, desencadeada por microrganismos patogênicos ou suas toxinas, [48]. Ressalta-se que todos os alimentos devem ser objeto de exames microscópicos e microbiológicos. Estes exames refletem as condições higiênicas que envolvem a produção, armazenamento, transporte e manuseio para elucidar a ocorrência de enfermidades transmitidas por alimentos. Os problemas encontrados podem ser minimizados através de sistemático controle de qualidade e programas de educação sanitária [36, 60].

Os estafilococos são bactérias Gram-positivas, imóveis, de forma esférica, medindo de 0,5 a 1,0µm, agrupadas em massas irregulares em forma de “cachos”. Apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, atuando sobre carboidratos com produção de ácidos, sendo aeróbias e anaeróbias facultativas. Podem crescer em temperaturas de 7 a 48°C, com um ótimo de 30 a 37°C [6]. O *S. aureus* é um dos agentes patogênicos mais co-

muns, responsável por surtos de intoxicação de origem alimentar. As peculiaridades do seu habitat tornam a sua presença largamente distribuída na natureza, sendo transmitido aos alimentos por manipuladores [11, 29], na maioria dos casos por portadores e também por animais, principalmente, gado leiteiro com mastites, apresentando altos números do microrganismo no leite [39].

A intoxicação alimentar provocada por este microrganismo é devido à ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento e representando um risco para saúde pública. A enterotoxina estafilocócica é termoestável e está presente no alimento mesmo após o cozimento, possibilitando desta forma, a instalação de um quadro de intoxicação de origem alimentar. Sendo o agente responsável por, aproximadamente, 45% das toxinfecções no mundo, vários trabalhos referem os manipuladores como os maiores responsáveis pela sua transmissão [1, 7, 16, 43, 48].

Atualmente, órgãos internacionais como, WHO (World Health Organization), ICMSF (International Committee on Microbiological Specification for Foods) e a APHA (American Public Health Association), recomendam padrões e métodos de análise microbiológica tanto clínica como de alimentos para a rotina laboratorial, testes bioquímicos mínimos para diferenciação na área clínica de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* e em análise de alimentos o *S. aureus* e *S. epidermidis*. No Brasil para a identificação de *S. aureus* são recomendados os testes de produção de coagulase, termonuclease,

¹ Recebido para publicação em 16/05/2001. Aceito para publicação em 07/02/2002.

² Departamento de Ciências Básicas em Saúde da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT).

³ Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Rua Jader de Andrade, nº 335, Casa Forte, CEP: 52061-060, Recife – PE. BRASIL. newtonps@novaera.com.br.

* A quem a correspondência deve ser enviada.

coloração de Gram e catalase, permitindo diferenciar o *S. aureus* de *S. intermedius* e *S. hyicus* [9, 56, 57, 62].

O Ministério da Saúde através da Portaria 451 de 19/09/1997, no anexo II, regulamenta a utilização dos testes acima citados, referindo que cepa positiva, para todos os testes, é classificada como *S. aureus*, exceto quando isolada de leite e produtos derivados, nos quais as cepas reativas recebem a denominação de estafilococos coagulase positiva [8]. Alguns autores relacionam testes bioquímicos como a produção de coagulase, termonuclease, hemólise e fermentação de manitol com a capacidade das cepas de *Staphylococcus spp* e *S. aureus* em produzirem enterotoxinas. Estes são testes indiretos, úteis para detecção de cepas potencialmente enterotoxigênicas, embora autores tenham verificado que características fisiológicas podem ou não diferenciar cepas enterotoxigênicas das não enterotoxigênicas [19, 65].

A intoxicação alimentar estafilocócica é caracterizada por náuseas, vômito, dores abdominais e diarreia, e por um curto período de incubação, de 1 a 6 horas após a ingestão do alimento responsável [41, 49].

O período de incubação e a severidade dos sintomas, depende da quantidade de enterotoxina ingerida e da susceptibilidade do indivíduo. Níveis dessas toxinas variando de 0,01 a 0,4 µg por grama do alimento são suficientes, para provocar a intoxicação, afetando indivíduos mais sensíveis [46].

A técnica imunoenzimática, que permite a detecção de enterotoxinas estafilocócicas, através do equipamento mini-VIDAS é a técnica ELFA – Enzyme-linked Fluorescent Assay, cuja diferença para o ELISA, consiste basicamente nos seguintes aspectos: utilização de um leitor da fluorescência desenvolvida durante a análise, reação antígeno – anticorpo utilizando anticorpos policlonais e uso da enzima fosfatase alcalina [63].

Os estudos microbiológicos de grupos de alimentos vêm progredindo sensivelmente, conforme pode ser constatado na literatura especializada, porém a escassez de publicações relativas à ocorrência de alimentos contaminados por toxinas estafilocócicas, no Estado de Pernambuco-Brasil, possibilita afirmar que se faz necessário a avaliação de alguns grupos de alimentos regionais, quanto a presença destes microrganismos e seus metabólitos.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Materiais

Analisou-se 37 amostras de camarão *in natura* procedentes da bacia pesqueira do litoral de Natal-RN, sendo selecionada uma cepa de *Staphylococcus spp*.

Dentre 75 amostras de alimentos processados foram selecionados aqueles que apresentaram positividade para Estafilococos Coagulase Positiva (SCP), sendo constituídos por três amostras de queijo coalho, uma de leite em pó integral, uma de peixe cozido, uma de arroz cozido, duas de macarrão, uma de carne de sol ao molho, uma

de carne homogeneizada light, uma de “beef burger extra light”, uma de pasta de alho e uma de fígado cozido.

2.2 – Métodos

2.2.1 – Preparo de diluições das amostras para contagem, isolamento e identificação de *Staphylococcus spp*

Foram utilizadas alíquotas de 10g de cada amostra em vidros com capacidade para 100mL, contendo 90mL de solução de NaCl 0,9% como diluente. A seguir, a amostra foi transferida para sacos plásticos estéreis e homogeneizadas em Stomacher 400 (Seward lab system – England) por 60 segundos [33]. Partindo-se da diluição inicial a 10^{-1} , preparou-se uma série de diluições decimais até diluição máxima exigida pela legislação para o grupo de alimento analisado, empregando-se tubos de ensaio com 9,0mL de diluente.

De cada uma das diluições da amostra de alimentos examinados transferiu-se 0,1mL para superfície de Agar Baird-Parker em placas. Em seguida, o inóculo era espalhado por toda a superfície do meio, com o auxílio de alça de Drigalsky e as placas foram incubadas a 36°C por 48 horas.

Após a incubação, procedeu-se a contagem do número de colônias que apresentavam características típicas como, cor negra brilhante, com zona de precipitação branca ao seu redor e circundada por um halo transparente. Os números de colônias contados foram multiplicados pelo fator 10 e, em seguida, pela recíproca da diluição correspondente a placa de contagem, obtendo-se assim o valor da contagem presuntiva de *Staphylococcus spp*, por grama de alimento examinado. As colônias suspeitas foram semeadas na superfície de ágar nutriente inclinado, seguido de incubação a 36°C por 24 horas.

A verificação microscópica da morfologia das células isoladas foi realizada pelo método de Gram com lâminas, preparadas a partir das culturas em tubos de ágar nutriente inclinado. As células que se apresentaram como cocos Gram positivos, agrupados em forma de *cacho*, eram submetidas às provas de identificação bioquímica [5, 24, 31].

2.2.2 – Provas Bioquímicas

Prova de Catalase e DNase [32], prova de coagulase [58], prova de utilização de glicose e maltose e teste de Voges-Proskauer segundo a metodologia descrita por MAC FADDIN [38], utilização de manitol e crescimento em NaCl a 7,5% de acordo com CHAPMAN [12];

2.2.3 – Extração e detecção da produção de termonuclease

A extração da enzima foi realizada pelo método descrito por TATINI *et al.* (1975), adaptado por HIROOKA, VICENTE, YOSHIMOTO [26]. O teste de detecção da enzima foi realizado pelo método descrito por LACHICA, HOEPRICH, FRANTI [35]. As cepas foram inoculadas em caldo infusão cérebro coração (BHI) e incubadas a 36°C

por 24 horas. Após este período adicionou-se 500µL de ácido tricloroacético (TCA 3,0M) à suspensão bacteriana, e submeteu-se à centrifugação a 7.800rpm por 15 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 1,5mL de tampão TRIS 0,5M com pH 10,0 adicionado de 1% de peptona bacteriológica. A atividade nucleásica foi realizada em placas contendo ágar azul de orto-Toluidina - DNA, onde foram feitos poços nos quais foram inoculados 5µL da mistura (precipitado + tampão TRIS 0,5M, pH 10,0), previamente aquecida a 100°C por 15 minutos para inativação de nucleases termossensíveis. As placas foram incubadas a 50°C por 4 horas e os poços que apresentaram halo de cor rosa foram considerados positivos.

2.2.4 – Produção e detecção de enterotoxina

Produção da enterotoxina – As cepas que apresentaram positividade ao teste de termonuclease foram ativadas em caldo BHI. A seguir retirou-se uma alíquota de 2mL e transferiu-se para caldo BHI, enriquecido com 1% de extrato de levedura (EY), incubando-se em mesa agitadora a 150r.p.m. por 18 horas a 36°C.

Purificação da enterotoxina – retirou-se uma alíquota de 2mL de inóculo do caldo BHI, colocou-se em tubo de filtração/centrifugação (VIDAS tubes SET-bioMérieux Vitek-France) à temperatura de 4°C por 15 minutos a 3000rpm.

Detecção das enterotoxinas – Após a filtração e centrifugação, retirou-se uma alíquota de 500µL do filtrado, colocou-se no poço do barrete do Kit VIDAS SET “Staph Enterotoxin” e submeteu-se ao exame do leitor de ELFA a 450nm, mini VIDAS (mini VIDAS bioMérieux, Inc.France). As amostras que apresentaram títulos de VT (valor do teste) < 0,13 foram consideradas negativas para presença de enterotoxina e aquelas que apresentaram títulos de VT ≥ 0,13 consideradas positivas [63]. VT é a relação entre a fluorescência relativa do padrão e a fluorescência relativa da amostra.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionadas quinze cepas de estafilococos coagulase positiva isoladas de amostras de alimentos *in natura* e processados, de diferentes procedências. Observa-se na *Tabela 1* que os resultados das contagens deste microrganismo apresentaram variação de 10^2 a $3,0 \times 10^4$ UFC/g.

A amostra de leite em pó apresentou contagem de estafilococos coagulase positiva de $1,5 \times 10^4$ UFC/g. Este resultado foi superior ao valor estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA [9], que determina o padrão de 10^2 UFC/g do produto para estafilococos coagulase positiva, e, portanto, a amostra deve ser considerada como *produto em condição higiênico-sanitária insatisfatória*. A presença de SCP em alimentos indica a possível presença de enterotoxina estafilocócica, entretanto, a ausência ou presença de pequeno número deste microrganismo, sobretudo em alimentos processados submetidos a tratamento térmico

co não indica que estes produtos não possam ocasionar intoxicação.

As características do alimento e as condições de processamento podem diminuir ou matar as células bacterianas, entretanto, as enterotoxinas podem permanecer ativas, e já foram descritos surtos ocasionados pelo consumo de leite em pó, no qual não se isolou o microrganismo [42]. Essa afirmação foi confirmada por OLIVEIRA *et al.* [45], pesquisando a relação entre a qualidade de leite em pó e alguns parâmetros microbiológicos do leite cru utilizado como matéria-prima, e neste material foi verificada a contagem de *S. aureus* de 10^3 UFC/g, enquanto que no leite em pó este microrganismo estava ausente.

As amostras de queijo tipo coalho procedentes de diferentes locais da cidade do Recife (supermercado, microempresa e hospital), apresentaram contagens de estafilococos coagulase positiva inferiores às encontradas por CABRAL [10] em 50 amostras de queijo tipo coalho na cidade de João Pessoa-PB; a autora verificou que 37 amostras foram positivas para *S. aureus*, com contagem média de $1,2 \times 10^5$ UFC/g. Resultados semelhantes foram obtidos por GOMES & GALLO [20], quando analisaram queijo minas frescal em Piracicaba-SP. Entretanto, SABIONI, NASCIMENTO, PEREIRA [53] em levantamento realizado com trinta amostras de queijo minas frescal na cidade de Ouro Preto-MG, encontraram resultados positivos para o *S. aureus* com contagem até 10^8 UFC/g. Das amostras analisadas de queijo tipo coalho, duas apresentaram-se acima do padrão [8], e como este produto é consumido sem sofrer nenhum tratamento térmico após seu processamento, o mesmo representa um risco para a saúde do consumidor. Estes resultados demonstram que a produção ou manipulação subsequente deste produto foi realizada em condições higiênicas deficientes, que podem proporcionar a contaminação por *S. aureus*.

Os resultados dos produtos cárneos como carne ao molho, carne homogeneizada light, “beef-burguer extra light” e fígado ao molho, provenientes de restaurantes e supermercados também deram contagens acima do padrão (*Tabela 1*). As amostras de carnes cozidas apresentaram-se fora do padrão legal que é de 10^2 UFC/g, e das carnes cruas uma não atendeu o padrão, estando acima de 10^3 UFC/g de *S. aureus* [8]. Resultados superiores foram obtidos por ISIGIDI, DEVRIESE, VAN HOOFF [30] em Gent-Bélgica, quando estudaram 52 amostras de carne moída crua e por FLORENTINO *et al.* [15], que analisaram carne moída comercializada em João Pessoa-PB. Dados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram obtidos por FUZIHARA & FRANCO [17] em carne suína, na cidade de Santo André-SP.

Nos últimos anos, tem sido crescente a preocupação dos agentes de inspeção sanitária, com as condições higiênicas de produtos cárneos processados e distribuídos ao consumo. A contaminação da carne pode ocorrer em qualquer etapa da industrialização, e neste trabalho observou-se que as amostras com maior manipulação apresentaram resultados superiores a 10^3 UFC/g.

As características de composição, peculiares a cada tipo de produto cárneo, aliadas à diversidade de processamento e condições de embalagem, determinam a microbiota capaz de proliferar no produto. Como mostra o trabalho desenvolvido por MARIN, ROSA, CORNEJO [40] com 233 amostras de presunto curado e seco, na Espanha, os autores verificaram contagem de *S. aureus* $<10^2$ a 10^4 UFC/g. Amostras de carne de sol, produto artesanal da região Nordeste do Brasil, analisadas por SILVA, STAMFORD, LIMA [55], apresentaram contagem de 10^2 a 10^6 UFC/g. HOFFMANN *et al.* [27], analisando lingüiça artesanal de frango na cidade de São José do Rio Preto observou contagens entre $2,0$ a $14,0 \times 10^3$ UFC/g. Na mesma cidade, HOFFMANN, GARCIA-CRUZ, VINTURIM [28], estudando condições higiênicas de salame, em 8 amostras encontraram contagens variando de $<10^2$ a $4,6 \times 10^4$ UFC/g. Desta maneira, nota-se que o produto cárneo preparado e conservado em condições sanitárias inadequadas, revela-se com contagens altas de microrganismos podendo acarretar problemas na qualidade do produto e na segurança do consumidor.

Os resultados das contagens de estafilococos coagulase positiva em uma amostra de peixe cozido e outra de camarão cru (Tabela 1), foram inferiores ao padrão que é de 10^3 e de $5,0 \times 10^2$ UFC/g, respectivamente, atendendo as recomendações da legislação vigente [9]. Esses dados foram inferiores aos encontrados por AQUINO *et al.* [3], em pescado congelado, na cidade de Manaus e por DAMS, BEIRÃO, TEIXEIRA [13] em filés de peixe no estado de Santa Catarina. HILUY *et al.* [25], avaliando 22 amostras de produtos pesqueiros (peixe, ostras e camarão), verificaram a ocorrência de *S. aureus* em 50% das amostras de camarão e 20% das amostras de peixe, relatando a manipulação inadequada na captura, processamento e manuseio.

Observou-se que dos amiláceos analisados (arroz, farinha de trigo e macarrão) (Tabela 1), o número de UFC/g de estafilococos coagulase positiva variou de acordo com a procedência, sendo interessante verificar que a amostra de macarrão e de arroz cozidos, procedentes de restaurante, apresentaram contagens similares ($1,1 \times 10^4$ e $3,0 \times 10^4$ UFC/g), estando estas amostras fora do padrão, como a amostra de farinha de trigo ($8,0 \times 10^2$ UFC/g) procedente de moinho localizado na cidade de Olinda. A amostra de macarrão proveniente de indústria localizada na cidade do Recife encontra-se dentro dos padrões.

Os resultados obtidos mostram que as condições de higiene em que os alimentos são beneficiados ou preparados é um dos fatores responsáveis pelo crescimento de microrganismos. Vale ressaltar que a atividade de água reduzida ($a_w=0,86$) permite o crescimento de *S. aureus*, que é compatível com a atividade de água dos alimentos anteriormente citados. STWARTZENTRUBER *et al.* [59], analisando a qualidade microbiológica de 3.084 amostras de macarrão e produtos obtidos de macarrão, procedentes do mercado varejista em Washington, relataram o crescimento de *S. aureus* em 2% das amostras, com valores entre 10^4 a 10^6 UFC/g, dados que compro-

vam a possibilidade do desenvolvimento deste microrganismo em alimentos com baixa atividade de água.

A amostra de alho (*Allium sativum*) em pasta apresentou crescimento de estafilococos coagulase positiva com uma população de $5,5 \times 10^2$ UFC/g (Tabela 1), resultado este que atende ao padrão do Ministério da Saúde que é de 10^3 UFC/g para *S. aureus*, [8]. GONZÁLEZ-FANDOS *et al.* [23], verificando o efeito do alho desidratado sobre a síntese de termonuclease e enterotoxina por *Staphylococcus sp.*, encontrou crescimento de uma população menor ou igual 10^6 UFC/mL em meio contendo 2% de alho desidratado. Os resultados evidenciam que este microrganismo tem capacidade de se desenvolver na presença de substâncias bactericidas em baixa concentração. SCHWAD *et al.*, [54], analisando a qualidade microbiológica de alguns temperos e ervas em mercados varejistas em Washington, não encontrou a presença de *S. aureus* em temperos como sementes de aipo, alho, canela, cravo da índia, gengibre, noz-moscada, orégano, páprica, pimenta, alecrim e tomilho.

TABELA 1. Contagem de SCP (Estafilococos Coagulase Positiva) em alimentos in natura e processados comercializados na cidade do Recife, PE. Brasil

| Alimentos | nº amostras | UFC/g |
|---------------------------|-------------|---------------------------------------|
| Leite em pó integral | 01 | $1,5 \times 10^4$ |
| Queijo coalho | 03 | $<10^2$ a $1,5 \times 10^4$ |
| Carne ao molho | 01 | $1,5 \times 10^4$ |
| Carne homogeneizada light | 01 | $5,5 \times 10^2$ |
| Beef burger extra light | 01 | $1,0 \times 10^4$ |
| Peixe cozido | 01 | $9,5 \times 10^2$ |
| Pasta de alho | 01 | $5,5 \times 10^2$ |
| Farinha de trigo | 01 | $8,0 \times 10^2$ |
| Macarrão | 02 | $5,0 \times 10^2$ a $1,1 \times 10^4$ |
| Camarão | 01 | $4,0 \times 10^2$ |
| Fígado | 01 | $1,5 \times 10^4$ |
| Arroz | 01 | $3,0 \times 10^4$ |

UFC/g = Unidade formadora de colônia por grama de alimento.

As quinze cepas de *Staphylococcus spp* isoladas de alimentos *in natura* e processados foram submetidas ao teste de coagulase e os resultados apresentados mostram que 100% apresentaram positividade para o teste realizado. LOPES & STAMFORD [37], ao analisarem 88 cepas de *Staphylococcus spp* isoladas de leite cru, detectaram que 54,5% das amostras foram coagulase positiva.

Os resultados do teste de termonuclease das quinze cepas de *Staphylococcus spp* isoladas de amostras de alimentos mostram positividade para (40%) dos isolados (Figura 1). LOPES & STAMFORD [37], analisando cepas de *Staphylococcus spp* isoladas de leite cru de vaca, verificaram que 46% delas apresentaram reação de termonuclease positiva. Por outro lado, esses resultados diferem dos obtidos por SILVA, STAMFORD, LIMA [55], ao analisarem 271 cepas de *Staphylococcus spp* isoladas de amostras de carne de sol, quanto a capacidade de produzirem a enzima termonuclease, verificaram positividade de 15%.

A identificação confirmatória das cepas (Tabela 2) foi realizada através de provas bioquímicas complementares, e os resultados mostram o isolamento de uma cepa de *S. aureus* e duas de *S. intermedius*. Oito cepas permaneceram com a identificação presuntiva de *S. aureus*, por apresentarem reações de coagulase e/ou termonuclease e maltose positivas, segundo critérios citados por MOSSEL [44] e SPECK [57]. Quatro cepas foram identificadas como estafilococos coagulase positiva SCP, porque os critérios bioquímicos utilizados não permitiram classificar as linhagens ao nível de espécies. Para identificação das espécies, utilizou-se o teste de acetoina (teste de Voges – Proskauer) o qual é recomendado pelo Conselho Nacional de Mastite – USA, como um meio adicional para diferenciação de *S. aureus* das outras cepas coagulase positiva, pois esta apresenta alto grau (90%) de positividade para acetoina a partir de glicose, enquanto as cepas de *S. intermedius* e *S. hyicus* são acetoina negativas [51].

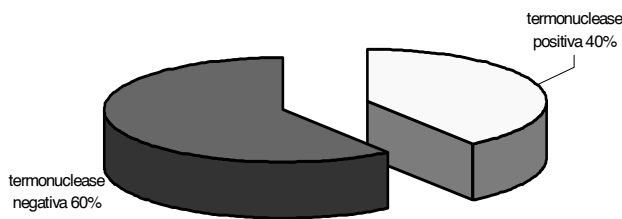


FIGURA 1. Gráfico da distribuição Percentual de 15 cepas de *Staphylococcus spp* para a enzima termonuclease.

TABELA 2. Comportamento de cepas identificadas de *Staphylococcus spp*, isoladas de alimentos *in natura* e processados, com relação aos testes bioquímicos.

| Número Total | Espécies de <i>Staphylococcus</i> | | | |
|---------------------------|-----------------------------------|------------------|--------------------|-----|
| | <i>aureus</i> * | <i>aureus</i> ** | <i>intermedius</i> | SCP |
| 15 | 1 | 8 | 2 | 4 |
| | Reações positivas | | | |
| Testes Bioquímicos | | | | |
| Coagulase | 1 | 8 | 2 | 4 |
| Termonuclease | 1 | 2 | 2 | 1 |
| Catalase | 1 | 8 | 2 | 4 |
| Acetoina | 1 | 8 | 0 | 2 |
| Manitol | 1 | 3 | 2 | 2 |
| Maltose | 1 | 6 | 1 | 1 |
| Glicose A | 1 | 6 | 1 | 1 |
| Glicose An | - | 6 | 1 | 2 |
| DNase | 1 | 7 | 2 | 3 |
| Crescimento em NaCl 7.5% | 1 | 7 | 2 | 3 |

*S. aureus - com identificação confirmatória;
 **S. aureus - somente com identificação presuntiva;
 SCP - estafilococos coagulase positiva;
 Glicose A - glicose em aerobiose;
 Glicose An - glicose em anaerobiose.

Os resultados da identificação das cepas isoladas em outros alimentos (Tabela 3) mostraram ocorrência elevada de *S. aureus* (identificadas presuntivamente) e SCP, nos seguintes alimentos: leite em pó, queijo tipo coalho, carne ao molho, carne homogenizada light, “beef burger extra light”, fígado, farinha de trigo, macarrão e arroz. A identificação confirmatória ao nível de espécie só foi possível para cepas *S. aureus* em camarão e de *S. intermedius*, em peixe cozido e pasta de alho.

Vários pesquisadores trabalhando com alimentos tem detectado uma incidência apreciável destes microrganismos principalmente naqueles produtos de origem animal ou submetidos a intensa manipulação. FLORENTINO *et al.* [15], analisando 120 amostras de carne moída comercializada, na cidade de João Pessoa – PB, encontrou 73,3% de positividade para *S. aureus* nas amostras de feiras livres e 53,3% nas coletadas em supermercados. HOFFMANN *et al.* [27], trabalhando com oito amostras de salame em São José do Rio Preto – SP isolou *S. aureus* de todas as amostras. MARIN, ROSA, CORNEJO [40], analisando 233 amostras de presunto seco e curado isolou de 133 (57%), *S. aureus* e de 2 (0,9%), de *S. epidermidis*. Pode-se observar que nas carnes e produtos derivados há elevada incidência de *S. aureus*, resultados estes que são justificados pela origem ou pela manipulação durante o processamento desses alimentos.

TABELA 3. Identificação de cepas de *Staphylococcus* isoladas de alimentos *in natura* e processados.

| Alimentos | Nº de amostras | Espécies isoladas |
|------------------------------|----------------|-----------------------|
| Alimentos Processados | | |
| Leite em pó integral | 01 | <i>S. aureus</i> * |
| Queijo tipo coalho | 02 | SCP |
| | 01 | <i>S. aureus</i> * |
| Carne ao molho | 01 | <i>S. aureus</i> * |
| Carne homogeneizada light | 01 | SCP |
| Beef burger extra light | 01 | SCP |
| Peixe cozido | 01 | <i>S. Intermedius</i> |
| Pasta de alho | 01 | <i>S. Intermedius</i> |
| Farinha de trigo | 01 | <i>S. aureus</i> * |
| Macarrão | 02 | <i>S. aureus</i> * |
| Fígado | 01 | <i>S. aureus</i> * |
| Arroz | 01 | <i>S. aureus</i> * |
| Alimento in natura | | |
| Camarão | 01 | <i>S. aureus</i> ** |

*S. aureus - somente com identificação presuntiva
 **S. aureus - com identificação confirmatória
 SCP - estafilococos coagulase positiva

Na Tabela 3 observa-se a positividade para *S. aureus* e SCP em leite em pó e queijo tipo coalho. Vale salientar que diversos autores têm se preocupado em avaliar a qualidade do leite cru que posteriormente será beneficiado. GONÇALVES & FRANCO [21] detectaram a ocorrência de *S. aureus* em 30 amostras de leite pasteurizado dos tipos “B” e “C”. LOPES, STAMFORD [37] avaliando os pontos críticos de controle numa plataforma de processamento de leite localizado na cidade do Recife-PE observaram que os pontos críticos no fluxograma de beneficiamento do leite são os tanques de estocagem e o processo de envase. Diante do exposto, torna-se evidente a necessidade de um permanente controle higiênico-sanitário do leite para consumo humano durante a produção, industrialização e comercialização, evitando desta forma um produto com números elevados de microrganismos, os quais comprometem as suas propriedades organolépticas e nutritivas, representando também um risco para a saúde do consumidor.

Entretanto, alguns dados como os obtidos por WENDPAP, ROSA, LIMA [64] ao examinarem 50 amostras de leite pasteurizado tipo “C” não verificaram a pre-

sença de *S. aureus*. EUTHIER, TRIGUEIRO, RIVERA [14] analisando 20 amostras de queijo de leite de cabra tipo *coalho* não isolaram cepas deste microrganismo de nenhuma amostra, dado este diferente dos encontrados neste trabalho, o que se explicaria por cuidados higiênicos desde a obtenção da matéria-prima até o processamento e distribuição.

Os resultados apresentados na *Tabela 3* mostram que alguns produtos mesmo não sendo de origem animal, mas que sofrem intensa manipulação podem veicular *Staphylococcus* spp. Isto é também demonstrado pelos dados de GONZALES, MONTEIRO, OLIVEIRA [22] que estudando 20 amostras de queijo de soja (tofu) isolaram *S. aureus* de 100% das amostras analisadas. SWARTENTRUBER *et al.* [59], estudando 3084 amostras de macarrão e produtos de macarrão detectou 1% das amostras contaminadas com *S. aureus*. Existem também produtos que contêm substâncias naturais com efeitos bactericidas e/ou bacteriostáticos nos quais o *Staphylococcus* spp tem o seu crescimento inibido ou bloqueado como pode ser demonstrado pelos dados de SCHWAD *et al.* [54] que analisando 1600 unidades de condimentos e ervas, como sementes de aipo, canela, cravo-da-india, alho, gengibre, noz-moscada, orégano, páprica, alecrim e tomilho, não isolou *S. aureus* de nenhuma das amostras.

Têm sido realizados estudos no sentido de correlacionar a produção de enterotoxina com a presença das enzimas coagulase e termonuclease, como também com outras provas bioquímicas e fisiológicas do *Staphylococcus* spp [5, 24, 52].

Os resultados apresentados mostram o comportamento bioquímico das 15 linhagens isoladas e das quais foram selecionadas 06 cepas termonuclease positivas, com reação bem evidente neste teste, para serem submetidas a prova de detecção de enterotoxina. GELLI & MARTINS [18] destacaram a importância do teste da termonuclease, tendo em vista que esta enzima é forte indicadora de presença da enterotoxina estafilocócica em alimentos.

Do total de 06 cepas de *Staphylococcus* spp que foram submetidas ao teste de produção de enterotoxinas, todas foram positivas por apresentarem VT (Valor do Teste) acima de 0,13. Caracterizaram-se como enterotoxigênicas, cepas de *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. aureus* (cepas com identificação presuntiva) e o grupo de SCP, sendo isoladas de camarão, peixe cozido, pasta de alho, queijo tipo coalho e macarrão.

As cepas isoladas de queijo tipo coalho apresentaram 100% de positividade para enterotoxina estafilocócica, o que é comum segundo OTERO *et al.* [47], pois as características dos queijos frescos, favorecem a multiplicação de estafilococos e a produção de enterotoxinas. TORNADIJO *et al.* [61] isolou 22 cepas de *Staphylococcus* spp de queijo de leite de cabra tipo *armada-sobado*, detectando enterotoxina produzida por duas de *S. sciuri* e três de *S. aureus*.

Alimentos que sofrem manipulação são potencialmente capazes de causar intoxicação estafilocócica e os manipuladores são importantes fontes de contaminação

de *S. aureus*. Trabalhos realizados por ANDRADE & ZELANTE [2] avaliando a ocorrência de *S. aureus* enterotoxigênicos nas mãos, boca e fezes em portadores assintomáticos, verificaram que 24,8% das linhagens isoladas foram enterotoxigênicas. Resultados similares foram descritos por PEREIRA *et al.* [50], trabalhando com manipuladores de alimentos de cozinha industrial encontraram 30,9% de cepas enterotoxigênicas dos 55 isolados de *S. aureus*.

A detecção de *Staphylococcus* enterotoxigênico em peixe cozido, camarão, pasta de alho e macarrão, sugerem contaminação pela manipulação, pois estes são alimentos que necessitam de processamento.

No Brasil pesquisas realizadas em diferentes regiões do país, mostraram a ocorrência de *S. aureus* em pescado [13, 25]. No Estado de Santa Catarina AYULO, MACHADO, SCUSSEL [4], relataram a produção de enterotoxinas (EEA, EED e EEB) em carnes de marisco. Até o momento não há relato de *S. aureus* enterotoxigênico em camarão (*Penaeus vanamei*) na literatura consultada, o que diferencia dos resultados deste trabalho.

A ocorrência de *S. intermedius* enterotoxigênico em pasta de alho, é preocupante, pois este é um tempero muito difundido na culinária mundial. Deve ser salientado que KYUNG, PARK, KIM [34] e GONZALEZ-FANDOS *et al.* [23], analisando a flora residente e o efeito bactericida e bacteriostático do alho (desidratado e reconstituído a 1%, e na forma de extrato em concentrações de 5% e 20%), sobre linhagens de *S. aureus* enterotoxigênicas, verificaram que estas se multiplicam nas concentrações citadas, produzindo enterotoxinas e confirmando os riscos deste alimento como veículo de enterotoxinas estafilocócicas.

O gênero *Staphylococcus* é o agente responsável por aproximadamente 45% das toxinfecções no mundo. A contaminação por *Staphylococcus* spp, pode ser durante os estágios de produção ou estocagem do alimento, por cepas de origem ambiental ou humana. Encontrando condições favoráveis como aquecimento ou refrigeração em temperatura inadequada, este microrganismo cresce e pode produzir toxinas. O controle das enterotoxinas é possível desde que se observe as boas práticas sanitárias de higiene nos estágios de obtenção, produção, estocagem e manuseio de alimentos, pois a proteção ao público contra esta doença ocasionada por este produto tóxico é uma obrigação de profissionais da área de alimentos e da saúde.

4 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram inferir as seguintes conclusões:

- As espécies de *Staphylococcus* que ocorreram nos alimentos foram: *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. aureus* (com identificação presuntiva), além do grupo de SCP (estafilococos coagulase positiva);
- Verificou-se uma relação entre a produção da enzima termonuclease com a produção de enterotoxinas pelas espécies analisadas;

- O *S. aureus* apresentou maior ocorrência agrupando-se cepas com identificação presuntiva e confirmatória;
- As cepas de *Staphylococcus* produtoras de enterotoxinas foram isoladas dos seguintes alimentos: camarão, queijo tipo coalho, macarrão, peixe cozido e pasta de alho.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALCARÁZ, L.E.; SATORRES, S.E.; SEPÚLVEDA, L.; CENTORBI, O.N.P. Detecção de *Staphylococcus aureus* spp. em manipuladores de alimentos. **La Alimentación Latino americana**, v. 219, p. 44-47, 1997.
- [2] ANDRADE, G.P.; ZELANTE, F. Ocorrência simultânea de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos nas mãos, boca e fezes em portadores assintomáticos. **Revista de Saúde pública**, v. 23, n. 4, p. 277-84, 1989.
- [3] AQUINO, J.S.; VASCONCELOS, J.C.; INHANUMS, A.J.; SILVA, M.S.B. Estudo microbiológico de pescado congelado comercializado em Manaus (AM). **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 14, n. 1, p. 78-82, 1996.
- [4] AYULO, A.M.; MACHADO, R.A.; SCUSSEL, V.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. **International Journal Food Microbiology**, v. 24, n. 1-2, p. 171-178, 1994.
- [5] BEHME, R.J.; SHUTTLEWORTH, R.; MCNABB, A.; COLBY, W.D. Identification of Staphylococci with a self-educating system using fatty analysis and biochemical test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 3075-3084, 1996.
- [6] BERGEY'S. **Manual of Determinative Bacteriology**. M.D. WILLIAMS & S.T. WILKINS, 9 ed., Baltimore, 1994, 787p.
- [7] BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Coordenação Geral de Laboratório Animal. **Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos - Revisão 1991/1992**.
- [8] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária, portaria n. 451 de 19/09/1997, **Princípios Gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos de alimentos**. Republicada no Diário Oficial n. 124-E de 02/07/1998.
- [9] BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução - RDC n. 12 de 02/01/2001, **Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial n. 07-E de 10/01/2001.
- [10] CABRAL, T.M.A. Coliformes totais e fecais, e *Staphylococcus aureus* enteropatogênico em queijo de "coalho" comercializado no município de João Pessoa, PB. João Pessoa, 1993. 88p. Tese de Mestrado em Tecnologia de Alimentos da Universidade federal da Paraíba.
- [11] CASTRO, M.M. de M.V.; IARIA, S.T. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico no vestíbulo nasal de manipuladores de alimentos em cozinhas de hospitais do município de João Pessoa, PB. **Revista de Saúde Pública**, v. 18, p. 235-245, 1984.
- [12] CHAPMAN, G.H. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. **Journal of Bacteriology**, v. 50, p. 201- 203, 1945.
- [13] DAMS, R.I.; BEIRÃO, L.H.; TEIXEIRA, E. Avaliação da qualidade microbiológica da pescadinha (*Cynoscion striatus*) inteira e em filés nos principais pontos críticos de controle de uma indústria de pescado congelado. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 14, n. 2, p. 151-162, 1996.
- [14] EUTHIER, S.M.F.; TRIGUEIRO, I.N.S.; RIVERA, F. Condições higiênico-sanitárias do queijo de leite de cabra "tipo coalho", artesanal elaborado no curimataú paraibano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 2, p. 1-8, 1998.
- [15] FLORENTINO, E.R.; LEITE JUNIOR, A.F.; SÁ, S.N., ARAÚJO, M.S.O.; MATINS, R.S. Avaliação da qualidade microbiológica da carne comercializada em Campina Grande, PB. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 47, p. 38-41, 1997.
- [16] FRANCO, B.G.M.; LANDGRAF, M. 1996. **Microbiologia de Alimentos**. Ed. Atheneu, São Paulo.
- [17] FUZIHARA, T.O.; FRANCO, B.D.G.M. Bactérias patogênicas e bactérias indicadoras de higiene em carne suína comercializada em Santo André - São Paulo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 13, n. 1, p. 77-88, 1993.
- [18] GELLI, D.S.; MARTINS, M.C. *Staphylococcus aureus* produtor de termonuclease em alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 46, n. 1/2, p. 103-109, 1986.
- [19] GILMOUR, A.; HARVEY, J. Staphylococci in milk and milk products. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 69, p. 147-166, 1990.
- [20] GOMES, H.A.; GALLO, C.R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizada tipo C e queijo "minas frescal" comercializados em Piracicaba - SP. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 15, n. 2, p. 158-161, 1995.
- [21] GONÇALVES, R.M.S.; FRANCO, R.M. Determinação da carga bacteriana em leite pasteurizado tipos "B" e "C", comercializados na cidade do Rio de Janeiro, RJ. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 53, p. 61-65, 1998.
- [22] GONZALEZ, A.G.M.; MONTEIRO, M.F.F.; Oliveira CAG. Avaliação Higiênico-sanitária do queijo de soja (tofu). **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 51, p. 33-35, 1997.
- [23] GONZÁLEZ-FANDOS, E.; GARCIA-LOPEZ, M.L.; SIERRA, M.L.; OTERO, A. Staphylococcal growth and enterotoxins (A-D) and the mononuclease synthesis in the presence of dehydrated garlic. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 549-552, 1994.
- [24] HARVEY, J.; GILMOUR, A. Isolation and characterization of staphylococci from goats milk produced in Northern Ireland. **Letters in Applied Microbiology**, v. 7, p. 79-82, 1998.
- [25] HILUY, D.J.; PINHEIRO, H.C.G.; MOURÃO, A.F.; MACEDO, E.P.; CARVALHO, M.L.M.; PINTO, A. Avaliação da qualidade dos produtos pesqueiros no estado do Ceará. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 45, p. 37, 1996.
- [26] HIROOKA, E.Y.; VICENTE, E.; YOSHIMOTO, Y. Detecção de termonuclease estafilocócica em leite: extração e manutenção da atividade enzimática. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 10, n. 2, p. 231-248, 1990.
- [27] HOFFMANN, F.L.; GARCIA-CRUZ, C.H.; GODOY, J.H.F.; VINTURIM, T.M. Análise microbiológica e sensorial de lingüiça de frango produzida artesanalmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 14, n. 1, p. 40-45, 1996
- [28] HOFFMANN, F.L.; GARCIA-CRUZ, C.H.; VINTURIM, T.M. Estudo higiênico-sanitário preliminar de amostras de salame. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 47, p. 30-34, 1997.
- [29] IARIA, S.T.; FURLANETTO, S.M.P.; CAMPOS, M.L.C. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais, São Paulo, 1976. **Revista de Saúde Pública**, v. 14, p. 93-100, 1980.

- [30] ISIGIDI, B.K.; DEVRIESE, L.A.; VAN HOOF, J. A note on the isolation of *Staphylococcus aureus* from raw minced meat. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 59, p. 403-406, 1985.
- [31] KLOOS, W.E. Systematics and the natural history of Staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 69, p. 25-37, 1990.
- [32] KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKERNBERGER, P.C.; WINN, W.C. 1999, **Diagnóstico Microbiológico- Texto y Atlas Color**. Editorial Medica Panamericana, 5ª edición, p. 1432.
- [33] KONUMA, H.; SUZUKI, A.; KURATA, H. Improved Stomacher 400 bag applicable to the spiral plate system for counting bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 765-769, 1982.
- [34] KYUNG, K.H.; PARK, K.S.; KIM, Y.S. Isolation and characterization of bacteria resistant to the antimicrobial activity of garlic. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 1, p. 226-229, 1996.
- [35] LACHICA, R.V.F.; HOEPRICH, P.D.; FRANTI, C.E. Convenient assay for Staphylococcal nuclease by the metachromatic well-agar-diffusion technique. **Applied Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 920-923, 1972.
- [36] LIVERA, A.V.S.; SANTOS, A.C.O.; MELO, E.A.; REGO, J.C.; GUERRA, N.B. Condições higiênicas-sanitárias de segmentos da cadeia alimentar de Pernambuco. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 42, p. 51-56, 1996.
- [37] LOPES, A.C.S.; STAMFORD, T.L.M. Pontos críticos de controle no fluxograma de beneficiamento do leite pasteurizado. **Arquivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 47, n. 4, p. 367-371, 1997.
- [38] MAC FADIN, J.F. 1973, **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. Buenos Aires, Argentina.
- [39] MACHOSVILLI, I.A.; PENNA, T.C.V.; COLOMBO, A.J. Resistência térmica de cepas de *Staphylococcus aureus* em solução tampão fosfato (pH 7,0) e em leite reconstituído. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 4, p. 323-329, 1991.
- [40] MARIN, M.E.; ROSA, M.C.; CORNEJO, I. Enterotoxigenic of *Staphylococcus* strains isolated from Spanish dry-cured hams. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 1067-1069, 1992.
- [41] MEEHAN, P.J.; ATKESON, T.; KEPNER, D.E.; MELTON, M. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving two different pathogens. **American Journal of Epidemiology**, v. 136, n. 5, p. 611-616, 1992.
- [42] MENDONZA, M.S.; RENDÓN, E.F.; GARZA, L.M. Demonstration of staphylococcal thermonuclease from powdered milk. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 33, n. 2-3, p. 135-139, 1991.
- [43] MIMS, C.A.; PLAYFAIR, J.H.L.; ROIT, I.M.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. 1995. **Microbiologia Médica**. Ed. Manole Ltda, São Paulo.
- [44] MOSSEL, D.A.A. 1982. **Microbiologia de los Alimentos**. Editora Acribia, Zaragoza.
- [45] OLIVEIRA, C.A.F.; GERMANO, P.M.L.; SPERS, A.; MESTRIERI, L.; MORENO, J.F.G. Relação entre qualidade do leite em pó e alguns parâmetros microbiológicos do leite utilizado com matéria-prima. **Resumo Q.8.3., V Congresso Latino-Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos e VI Simpósio Brasileiro de Microbiologia de Alimentos**. Águas de Lindóia, SP, 1998.
- [46] ORDEN, J.A. *et al.* Applicability of an immunoblot technique combined with a semi - automated electrophoresis systems for detect of staphylococcal enterotoxins in food extrats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 4083-85, 1992.
- [47] OTERO, A.; GARCÍA, M.L.; GARCÍA, M.C.; MORENO, B.; BERGDOLL, M.S. Production of Staphylococcal Enterotoxins C₁ and C₂ and Thermonuclease throughout the Growth Cycle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56 n. 2, p. 555-559, 1990.
- [48] PASSOS, M.H.C.R.; KUAYE, A.Y. Avaliação dos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos comprovados laboratorialmente no município de Campinas- SP no período de 1987 a 1993. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, n. 1, p. 77-82, 1996a.
- [49] PASSOS, M.H.C.R.; KUAYE, A.Y. Relato de surtos de intoxicação alimentar provocada por consumo de bolo contaminado por *Staphylococcus aureus* importância da higiene dos manipuladores e condições de conservação do alimento na prevenção da doença. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, n. 1, p. 71-76, 1996b.
- [50] PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; LARA, M.A.; DIAS, R.S.; BERGDOLL, M.S. Enterotoxigenic staphylococci from food handlers working in an industrial kitchen in Belo Horizonte, MG (Brazil). **Revista de Microbiologia**, v. 25, n. 3, p. 161-165, 1994.
- [51] ROBERSON, J.R.; FOX, L.K.; HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3217-3219, 1992.
- [52] ROSSI JÚNIOR, O.D.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L.A. Estudos comparativos entre os testes de termonuclease na identificação de *Staphylococcus aureus*. **Revista de Microbiologia**, v. 16, n. 4, p. 269-271, 1985.
- [53] SABIONI, J.G.; NASCIMENTO, D.; PEREIRA, J.L. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo minas em Ouro Preto (MG), 1992. **Higiene Alimentar**, v. 8, n. 33, p. 22-23, 1994.
- [54] SCHWAD, A.H.; HARPESTAD, A.D.; SWARTZENTRUBER, A.; LANIER, J.M.; WENTZ, B.A.; DURAN, A.P.; BARNARD, R.J.; READ Jr, R.B. Microbiology quality of some spices and herbs in retail markets. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 627-630, 1982.
- [55] SILVA, M.C.D.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, A.W.O. Condições higiênicas-sanitárias da carne de sol comercializada no município do Recife - Pernambuco. II. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, n. 2, p. 375-388, 1992.
- [56] SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 1997, Livraria Varela, São Paulo, p. 53-58.
- [57] SPECK, M.L. Compendium of methods for microbiological examination of foods. **APHA - American Public Health Association**, Washington, U.S.A., 1976. 701p.
- [58] SPERBER, W.H.; TATINI, S.R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 502-505, 1975.
- [59] SWARTZENTRUBER, A.; PAYNE, W.L.; WENTZ, B.A.; BARNARD, R.J.; READ Jr, R.B. Microbiological quality of Macaroni and noodle products obtained at retail markets. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 540-543, 1982.
- [60] TAVARES, M.; LOBANCO, C.M.; SAKUMA, H. Produtos de confeitaria salgados: avaliação microbiológica e físico-química. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 14, n. 1, p. 26-32, 1996.
- [61] TORNADILHO, M.E.; FRESNO, J.M.; CARBALLO, J.; SARMIENTO, R.M. Population levels, species, and characteristics of

- Microcaceae* during the manufacturing and ripening of Armada-sobado hard goat's milk cheese. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 11, p. 1200-1207, 1996.
- [62] VANDEPITTE, J.; ENGBAEK, K.; PIOT, P.; HEUCK, C.C. **Métodos básicos de laboratório em bacteriologia clínica**. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza, 1993, 122p.
- [63] VERNZOZY-ROZAND, C.; MEYRAND, A.; DELIGNETTE-MULLER, M.L.; JAUBEERT, G.; PERRIN, G.; LAPEYRE; RICHARD, Y. Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goat's milk lactic cheeses. **Journal Dairy Reserch**, v. 65, n. 2, p. 273 -281, 1998.
- [64] WENDPAP, L.L.; ROSA, O.O.; LIMA, M.G. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado em Cuiabá - MT. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 47, p. 34-37, 1997.
- [65] WILSON, I.G.; COOPER, J.E.; GILMOUR, A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of Staphylococcal enterotoxin genes *entB* and *entC* and thermonuclease gene *nuc*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1793-1798, 1991.

6 - AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, e a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.