

DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS DE *Staphylococcus* spp.  
ISOLADOS DE QUEIJO MINAS FRESCAL

Elaine Ibrahim de Freitas

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Orientador: Victor Augustus Marin

Rio de Janeiro

2005

Elaine Ibrahim de Freitas

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisistos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

---

Prof. Victor Augustus Marin (INCQS/FIOCRUZ)

---

Prof. João Carlos de Oliveira Tórtora (UFF/UGF)

---

Profª. Maria Helena Simões Villas Bôas (INCQS/FIOCRUZ)

Orientador:

---

Prof. Victor Augustus Marin

Rio de Janeiro  
2005

Freitas, Elaine Ibrahim

Detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo minas frescal./ Elaine Ibrahim de Freitas. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2005.

xiii, 106 p., il., tab.

Dissertação em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária/ INCQS, 2005. Orientador: Victor Augustus Marin. 1. *Staphylococcus aureus*. 2. Enterotoxinas Estafilocócicas. 3. Microbiologia de Alimentos. 4. Multiplex PCR.

A Deus pela proteção, pelo sustento e pela fidelidade em todos os momentos. À  
minha família pelo auxílio, pelas orações e pelo incentivo.

"Porque os meus pensamentos não são os vossos pensamentos, nem os vossos caminhos os meus caminhos, diz o Senhor. Porque, assim como os céus são mais altos do que a terra, assim são os meus caminhos mais altos do que os vossos caminhos, e os meus pensamentos mais altos que os vossos pensamentos. Porque, assim como desce a chuva e a neve dos céus, e para lá não torna, mas rega a terra, e a faz produzir, e brotar, e dar semente ao semeador, e pão ao que come. Assim será a palavra que sair da minha boca: ela não voltará para mim vazia, antes fará o que me apraz, e prosperará naquilo para que a enviei ."

Salmos, 55:8-11.

## *Agradecimentos*

À Deus pelo sustento, por mais essa etapa vencida e por ser o meu Senhor. À minha família pelo apoio, conforto e amor. A Carlos Alberto Souza da Costa Júnior por estar sempre presente, pela proteção e pelo amor.

Ao professor Victor Augustus Marin pelos conhecimentos transmitidos, pela receptividade, atenção e dedicação, além da inestimável orientação, fundamental à realização deste trabalho. Ao meu orientador minha admiração pelo profissionalismo e pela dedicação e disposição com que realiza seu trabalho.

- Maria Helena Simões Villas Bôas e a toda equipe da Coordenação de Pós-Graduação, Simone e Gisele, pelas árduas horas de trabalho e dedicação. Obrigada pelas excelentes oportunidades.

À André Luís Gemal, diretor do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

À Marise e Suely, chefes do Departamento de Microbiologia por todo apoio logístico. À Eugênio pela disponibilidade do uso de seu laboratório.

- Neide, Célia e Maria Helena pela amizade, apoio e disponibilidade de uso do Setor de Saneantes.

- Paola, Suely e Regina pelo apoio e disponibilidade de uso do Setor de Biologia Molecular. À Renata pela inestimável ajuda e amizade.

- Márcia, Carla e Valéria por todo apoio, amizade e disponibilidade de uso do Setor de Microbiologia de Alimentos.

Ao setor de Culturas de Referência pelo auxílio fundamental à realização deste trabalho.

Aos setores de Preparação de Meios de Cultura e de Esterilização de Vidrarias pelo auxílio, pela disponibilidade e pela amizade.

- Lúcia Werneck, chefe do Departamento de Imunologia e Regina pelo apoio logístico e amizade.

À Humberto e Aparecida pela disponibilidade de uso de seu laboratório.

Às funcionárias da Biblioteca do INCQS, Maria Luisa, Lucilene e Marta por todo auxílio, disponibilidade e amizade. À todos os funcionários do INCQS, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. João Carlos de Oliveira Tórtora por sua importante contribuição em minha vida acadêmica e profissional e por aceitar participar desta banca sem restrições compreendendo todas as dificuldades em relação ao tempo de entrega desta dissertação.

- Profa. Manuela da Silva por aceitar participar desta banca sem restrições compreendendo todas as dificuldades em relação ao tempo de entrega desta dissertação.

Ao apoio da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ.

## RESUMO

*S. aureus* é o principal representante dos estafilococos coagulase-positiva e é a espécie mais freqüentemente associada às doenças estafilocócicas, quer sejam de origem alimentar ou não. As enterotoxinas estafilocócicas são um grupo de proteínas de baixo peso molecular, de cadeia única, termoestáveis, pirogênicas, com característica emética e efeitos nas células do sistema imune. A ingestão de toxinas pré-formadas em alimentos produz diarreia e vômito após 2 a 8 horas, mas a quantidade de enterotoxina necessária para acarretar doença depende da susceptibilidade, do peso e da saúde da pessoa afetada. Os leites crus ou pasteurizados e os queijos têm sido freqüentemente implicados como veículos de transmissão de bactérias patogênicas e com surtos de intoxicações estafilocócicas relatados em todo o mundo. Este trabalho teve como objetivos a pesquisa de estafilococos coagulase-positiva isolados de queijos minas frescal de algumas regiões do Rio de Janeiro e a padronização de um protocolo de M-PCR para a detecção de genes de *S. aureus* que codificam para as suas enterotoxinas. Para a padronização da M-PCR foram utilizadas cinco cepas controle de *S. aureus*. Das 30 amostras de queijo minas frescal analisadas em nosso trabalho, 12 (40%) apresentaram contagens de estafilococos coagulase positiva acima de  $5 \times 10^2$  UFC/g, valor este estabelecido como limite permitido pela ANVISA para o queijo minas frescal. Dez por cento de nossas amostras apresentaram valores acima de  $10^5$  UFC/g, o que é preocupante principalmente pelo fato destes valores estarem muito próximos dos requeridos ( $10^5$  UFC/g a  $10^9$  UFC/g) pelas cepas enterotoxigênicas para a produção de enterotoxinas; e para a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica. Os resultados mostraram que na detecção direta dos genes das enterotoxinas A, B, C, D, E nos queijos minas frescal a multiplex PCR foi negativa, sendo necessário o isolamento de colônias estafilococos coagulase-positiva. Das 231 colônias isoladas foram selecionadas 111 colônias coagulase-positiva e coagulasenegativa para o teste da multiplex PCR. Trinta e quatro colônias (30,62%) foram positivas para algum dos cinco genes de enterotoxinas pesquisados. Os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,5%), marcado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV. Os resultados deste trabalho revelam que os queijos minas frescal obtidos e comercializados na área geográfica deste estudo estão em desacordo com o padrão legal vigente.

## ABSTRACT

*S. aureus* is one of the most important species of coagulase-positive group and it is often associated to staphylococcal diseases as food poisoning. The staphylococcal enterotoxins are a low weight, heat-stable protein group with a single chain, classified as emetic toxins, that are members of the pyrogenic toxin superantigen family and cause damage to immunity cells. The consume of foods with pre-formed toxins causes diarrhea and vomit after 2 to 8 hours, but the dose necessary to motive illness depends on human susceptibility, weight and health. The raw or pasteurized milk and cheeses are often considered as vehicle of the pathogenic bacteria and staphylococcal food poisoning outbreaks in all the world. The aim of this work was to isolate coagulase-positive staphylococcal from Minas cheese and the standardization of a Multiplex PCR (M-PCR) protocol for the detection of *S. aureus* enterotoxins genes. In the M-PCR standardization five strains of *S. aureus* were used as control. Thirty samples were examined and 12 (40%) showed counts of coagulase-positive staphylococcal above  $5 \times 10^2$  cfu/g, which is the limit established by ANVISA for Minas cheese. Ten percent of the samples showed counts above  $10^5$  cfu/g, and it is critical mainly because that is the counts requested by enterotoxigenic strains to produce enterotoxins and cause staphylococcal food poisoning outbreaks. The M-PCR results showed that the enterotoxins genes direct detection in Minas cheese failed. Its was necessary the isolation of staphylococcal coagulase-positive colonies. Two hundred and thirty one colonies were isolated and one hundred eleven coagulase-positive and negative colonies were selected to M-PCR assay. Thirty four colonies (30,62%) were positive for one among the five enterotoxins genes analized. The reaction products were separated by agarose gel electrophoresis (1,5%) stained with ethidium bromide, and visualized with UV light. The results of this work revealed that the Minas cheeses marketed in this geographic area were in disagreement with the Brazilian law.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- Aa – Atividade de água
- AOAC – *Association of Official Analytical Chemists International*
- APHA – *American Public Health Association*
- APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
- BAM – *Bacteriological Analytical Manual*
- BPF – Boas Práticas de Fabricação
- DOA – Doenças de Origem Alimentar
- ETA – oxina esfoliativa A
- ETB – Toxina esfoliativa B
- FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
- FDA – *United States Food and Drug Administration*
- FemA – *Factors essential for methicillin resistance*
- ICMSF – *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*
- IDF – *International Dairy Federation*
- INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- ISO – *International Organization for Standardization*
- M-PCR – Multiplex PCR
- OMC – Organização Mundial de Comércio
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PAMVet – Programa de Monitoramento e Controle de Medicamentos Veterinários em Alimentos
- PCR – *Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase
- SEA – Enterotoxina estafilocócica A
- SEB – Enterotoxina estafilocócica B
- SEC – Enterotoxina estafilocócica C
- SED – Enterotoxina estafilocócica D
- SEE – Enterotoxina estafilocócica E
- SUS – Sistema Único de Saúde
- TSST-1 – Toxina-1 da Síndrome do choque Tóxico
- UFC/g – Unidades Formadoras de Colônia por grama

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Microrganismos patogênicos e parasitas agrupados com base na severidade do risco.....	43
<b>Tabela 2</b> - Plano de severidade (caso) em relação ao grau de perigo à saúde e condições de uso.	45
<b>Tabela 3</b> - Recomendação de planos de amostragem de acordo com os riscos à saúde e condições de manipulação.....	
<b>Tabela 4</b> - Seqüência de nucleotídeos, localização do gene e tamanho dos produtos da PCR para os <i>primers</i> oligonucleotídeos gene-específicos utilizados neste trabalho.....	61
<b>Tabela 5</b> - Características morfotintórias, teste da catalase e coagulase das colônias isoladas de 20 amostras de queijos minas frescal.....	69
<b>Tabela 6</b> - Pesquisa de Estafilococos Coagulase Positiva em 30 amostras de queijos minas frescal - Isolamento .....	70
<b>Tabela 7</b> - Distribuição dos genes <i>femA</i> , <i>sea</i> , <i>seb</i> e <i>sed</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> nos 111 isolados.....	77

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Esquema 1</b> - Pesquisa de Estafilococos Coagulase Positiva em 30 amostras de queijo minas frescal .....	56
<b>Quadro 1</b> - Extração de DNA com o Kit Qiagen .....	58
<b>Quadro 2</b> - Protocolo de extração de DNA segundo Wang, Cao e Cerniglia (1997) .....	59
<b>Esquema 2 - 1ª etapa</b> - Contaminação artificial dos alimentos - Teste de sensibilidade e Detecção de bactérias vivas .....	65
<b>Esquema 2 - 2ª etapa</b> - Contaminação artificial dos alimentos - Teste de sensibilidade e detecção de bactérias vivas.....	66
<b>Esquema 3 - 1ª etapa</b> - Detecção de bactérias diretamente do queijo minas frescal .....	67
<b>Esquema 3 - 2ª etapa</b> - Detecção de bactérias diretamente do queijo minas frescal] .....	68
<b>Figura 1</b> - Duplex PCR para detecção dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , <i>see</i> e <i>femA</i> das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> de referência .....	71
Figura 2 - Multiplex PCR para detecção dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , <i>see</i> e <i>femA</i> das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	72
<b>Quadro 3</b> - Padronização do protocolo de Multiplex PCR.....	74
<b>Quadro 4</b> - Teste de robustez .....	75
Figura 3 - Detecção dos genes <i>femA</i> , <i>sea</i> e <i>seb</i> pela Multiplex PCR em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> de queijos minas frescal (amostra 30).....	78
<b>Figura 4</b> - Detecção do gene <i>femA</i> pela Multiplex PCR em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> de queijos minas frescal (amostra 5).....	78
Figura 5 - Detecção dos genes <i>femA</i> , <i>sea</i> e <i>seb</i> pela Multiplex PCR em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> de queijos minas frescal (amostras 25 e 28) .....	78

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
1.1. Doenças de Origem Alimentar .....	1
1.2. <i>Staphylococcus</i> spp .....	3
1.2.1. Morfologia e Identificação .....	5
1.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
1.2.3. Enterotoxinas produzidas por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
1.2.4. FemA .....	17
1.2.5. Patologia .....	19
1.2.6. Manifestações Clínicas .....	
1.2.7. Diagnóstico Laboratorial .....	21
1.2.8. Tratamento .....	22
1.2.9. Alimentos envolvidos em intoxicações estafilocócicas .....	23
1.3. Leite .....	23
1.4. Queijo Minas Frescal .....	26
1.5. Detecção de patógenos alimentares .....	29
1.5.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	0
1.5.2. Multiplex PCR .....	36
1.6. Critérios Microbiológicos para Alimentos e Segurança Alimentar .....	38
1.6.1. Planos de Amostragem .....	44
2. Objetivos .....	50
3. Justificativa .....	51
4. Metodologia .....	53
4.1. Plano de Amostragem .....	53
4.2. Pesquisa de Colônias de Estafilococos Coagulase Positiva .....	53
4.3. Padronização da Multiplex PCR .....	57
4.3.1. Cepas de Referência .....	57
4.3.2. Extração de DNA .....	57
4.3.3. Teste de Robustez .....	60
4.3.4. Reconstituição dos <i>primers</i> oligonucleotídeos .....	60
4.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Reação Multiplex PCR .....	62
4.5. Contaminação Artificial dos Alimentos - Teste de Sensibilidade e Detecção de Bactérias Vivas .....	63
4.6. Detecção das bactérias diretamente no queijo minas frescal .....	64

5. Resultados .....	69
5.1. Pesquisa de Estafilococos Coagulase Positiva - Isolamento .....	69
5.2. Padronização do protocolo de Multiplex PCR.....	71
5.3. Teste de Robustez da técnica .....	75
5.4. Contaminação Artificial e Detecção das Bactérias diretamente no queijo minas frescal .....	76
5.5. Distribuição dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sed</i> e <i>femA</i> nas colônias isoladas de 20 amostras de queijos minas frescal.....	76
6. Discussão .....	79
7. Conclusão.....	84
8. Referências Bibliográficas .....	85
9. Anexo .....	103

## 1 Introdução

---

### 1.1 Doenças de Origem Alimentar

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças de origem alimentar (DOA) são definidas como doenças usualmente infecciosas ou tóxicas, causadas por agentes que penetram no hospedeiro através da ingestão de alimentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003a). Os sinais e sintomas variam muito, dependendo dos agentes etiológicos, mas diarreia e vômito são os sinais mais comuns.

Vários agentes causadores de doenças no homem podem ser transmitidos pelos alimentos: produtos químicos (metais pesados, pesticidas, etc); toxinas naturais de plantas e de animais (alcalóides, histamina, etc); vírus (hepatite A, vírus da poliomielite, vírus Norwalk, Rotavírus, etc); parasitas (amebas, helmintos, etc); bactérias patogênicas e fungos toxigênicos. Entre os microrganismos de interesse em alimentos, destacam-se os enteropatogênicos, correspondentes àqueles cuja patologia se expressa no trato gastrointestinal (FRANCO & LANDGRAF, 2004).

As doenças microbianas de origem alimentar podem ser subdivididas em duas grandes categorias: a) Intoxicações alimentares, causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas. Estas toxinas são produzidas durante proliferação do(s) microrganismo(s) toxigênico(s) no alimento. Neste grupo estão *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* forma emética e os fungos produtores de micotoxinas; b) Infecções alimentares, causadas pela ingestão de alimentos contendo células viáveis de microrganismos patogênicos. Estes microrganismos aderem à mucosa do intestino humano e proliferam, colonizando-o. Em seguida, pode ocorrer a invasão da mucosa e penetração nos tecidos, ou ainda, a produção de toxinas que alteram o funcionamento das células do trato gastrointestinal. Entre as bactérias invasivas, destacam-se *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* invasora, *Yersinia enterocolitica*, entre outras. Entre as toxigênicas, incluem-se *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Campylobacter jejuni*, entre outras (FRANCO & LANDGRAF, 2004).

É difícil estimar a incidência global das DOA, mas segundo os dados disponíveis, só no ano 2000, 2,1 milhões de pessoas morreram de doenças diarréicas, que em sua maioria podem ser atribuídas à ingestão de água e alimentos contaminados. Em países industrializados, o percentual de pessoas que sofrem de DOA tem aumentado em torno de 30% a cada ano. Nos Estados Unidos, por exemplo, em torno de 76 milhões de casos de DOA resultaram em 325.000 hospitalizações e 5.000 óbitos (MEAD *et al*, 1999). Isto

equivale a um em cada quatro americanos ter uma doença gastrointestinal transmitida por alimento e que mais de um em 1.000 é hospitalizado. Os custos médicos na Inglaterra em 1996 foram estimados em 300–700 milhões de libras e, na Austrália, os cerca de 11.500 casos tem custo anual estimado em AU\$ 2,6 bilhões (TAUXE, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Na França, por um período de dois anos 1999-2000 (registros do Institut de Veille Sanitaire), ocorreram 1.267 surtos de DOA, envolvendo 17.378 pessoas, causando 1.383 hospitalizações e 10 mortes (LE LOIR, BARON & GAUTIER, 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003a).

De acordo com Tauxe (2002) existem cerca de 27 principais patógenos causadores de doenças que podem estar presentes em alimentos e estes 27 patógenos contribuem com 19% do número total estimado de casos atribuídos a infecções alimentares e 36% de mortes, sendo que a grande maioria restante é de patógenos ainda não identificados.

Adak, Long e O'Brien (2002) descrevem o ônus (mortalidade, morbidade, novas formas de apresentação, admissões hospitalares, e ocupação hospitalar) e a tendência das DOA nos nativos da Inglaterra e do País de Gales entre 1992 e 2000. Segundo seus resultados em 1995 havia uma estimativa de 10.464.004 casos de infecções intestinais nestes países. Aproximadamente 14% foram adquiridos em países estrangeiros, restando 9.021.129 de casos de infecções intestinais adquiridos na Inglaterra e no País de Gales. Destes, 2.365.909 casos (26,2%) foram estimados como doenças de origem alimentar e 989.928 (41,8%) foram atribuídos a microrganismos patogênicos conhecidos. Dentre eles, seis foram responsáveis por 92,7% das doenças de origem alimentar: *Yersinia* spp., *Campylobacter* spp., salmonelas não-tifóide, vírus Norwalk, e *Escherichia coli* não produtora de verotoxina.

Além dos 2.365.909 casos, ocorreram 21.138 admissões hospitalares e 718 mortes nestes países devido às DOA. Em 2000 estes números caíram 53,3% (1.338.772 casos, 20.759 admissões hospitalares, e 480 mortes). *Campylobacter* spp. foi a causa mais comum destas doenças no ano de 2000. Sua contribuição nas admissões hospitalares subiu de 54,8%, em 1992, para 81,6%, em 2000. As salmonelas permaneceram como a segunda maior causa de admissão hospitalar apesar da queda de seus números entre 1995 e 2000. *Staphylococcus aureus* em 1992 apresentou 25.493 casos, 626 admissões hospitalares e 771 dias de ocupação de vagas em hospitais. Nenhuma morte foi registrada devido à intoxicação alimentar estafilocócica. Em 2000, o número de casos de DOA devido à *S. aureus* caiu para 2.276 casos, 57 hospitalizações e 69 dias de ocupação de vagas em hospitais. Novamente, nenhuma morte foi registrada devido a intoxicação alimentar estafilocócica (ADAK, LONG & O'BRIEN, 2002).

Bem menos documentados, os países em desenvolvimento sustentam a maior parte do problema devido à grande extensão das DOA, inclusive daquelas causadas por parasitas. A alta prevalência de doenças diarreicas em muitos países em desenvolvimento sugere uma necessidade de maior atenção aos problemas de segurança alimentar. Embora as estatísticas brasileiras sejam precárias, acredita-se que a incidência de doenças microbianas de origem alimentar em nosso país seja bastante elevada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003a).

Novas ameaças de DOA ocorrem por várias razões. Elas incluem aumento em viagens e negócios internacionais, adaptação microbiana e mudanças nos sistemas de produção de alimentos, além do aumento do número de pessoas que comem em restaurantes, lanchonetes, cantinas, lojas de “*fast foods*” e alimentos vendidos nas ruas. Mudanças na população microbiana podem levar à evolução de novos microrganismos patogênicos e ao desenvolvimento de novos fatores de virulência em antigos patógenos, desenvolvendo resistência a antimicrobianos, o que pode dificultar o tratamento, ou mudanças na habilidade de sobrevivência em condições ambientais adversas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003a).

Considerando que as DOA são um considerável perigo para a saúde humana e para a economia dos indivíduos, famílias e nações, seu controle requer uma união de esforços dos três principais envolvidos nesta questão, a saber, o governo, as indústrias de alimentos e os consumidores (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003a).

Entre as ações corretivas e profiláticas necessárias para avanços no conhecimento da epidemiologia e controle destas doenças estão: a pesquisa de patógenos, a Análise de Riscos, as Boas Práticas de Fabricação, programas de controle da qualidade como o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC, programas agropecuários, como o PAMVET, e o estabelecimento de Grupos Técnicos.

## 1.2 *Staphylococcus* spp.

Em 1880, um cirurgião escocês, Sir Alexander Ogston publicou seus dados que mostravam conclusivamente que os cocos em forma de cachos eram a causa de uma série de doenças piogênicas no homem. Subseqüentemente ele nomeou o organismo de ‘*staphylococcus*’, um nome derivado do grego *staphyle*, que significa cacho de uvas, e de *coccus*, que significa grão ou semente (ONGSTON apud BAIRD-PARKER, 1990). Em uma série de experimentos clássicos ele demonstrou que quando injetava pus contendo estafilococos em ratos eles desenvolveram os mesmos sintomas observados nos pacientes

com as feridas de onde o pus foi retirado. Além disso, ele descobriu que quando o pus era aquecido ou tratado com fenol, a doença não ocorria (BAIRD-PARKER, 1990).

Rosenbach (apud BAIRD-PARKER, 1990) foi provavelmente o primeiro a conseguir o crescimento de estafilococos em uma cultura pura e a estudar suas características em laboratório. Ele considerou que um organismo que ele isolou do pus era idêntico àquele descrito por Ongston e, por essa razão, ele adotou o nome *Staphylococcus* para o gênero que ele elegeu para conter este organismo. Ele observou que colônias laranjas e brancas cresciam no meio sólido e nomeou *Staphylococcus pyogenes aureus* o organismo formador de colônias laranjas e de *Staphylococcus piogenes albus* aqueles formadores de colônias brancas (BAIRD-PARKER, 1990).

Desde o trabalho original de Rosenbach o escopo e o conteúdo do gênero *Staphylococcus* têm mudado enormemente. *Staphylococcus* foi colocado na Família *Micrococcaceae* por Winslow *et al.* (apud BAIRD-PARKER, 1990) em 1920. De 1908 e até as cinco primeiras edições do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, duas espécies de estafilococos foram reconhecidas, isto é, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Na sexta edição do Manual Bergey as duas espécies foram transferidas para o gênero *Micrococcus* por Hucker (apud BAIRD-PARKER, 1990) que concluiu que os estafilococos e os micrococos não eram distintos, e que os *Micrococcus*, tinham prioridade sobre os estafilococos. Todavia, o gênero *Staphylococcus* foi listado na sétima edição por Evans (apud BAIRD-PARKER, 1990), que mostrou que os estafilococos eram fisiologicamente distintos dos micrococos em sua habilidade de crescer anaerobicamente e em fermentar a glicose. Três espécies (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*) foram reconhecidas por Baird-Parker (apud BAIRD-PARKER, 1990) na oitava edição do Manual Bergey.

O primeiro relatório que associou os estafilococos com intoxicações alimentares foi provavelmente feito por Vaughan & Sternberg (DACK apud BAIRD-PARKER, 1990), que em 1884 descreveu uma investigação de um grande surto em Michigan, o qual se acreditava ter sido causado pela ingestão de queijo contaminado com estafilococos. Em menos de 30 anos depois, todavia, Barber (apud BAIRD-PARKER, 1990) demonstrou claramente que os estafilococos eram capazes de causar intoxicação como resultado do consumo de leite oriundo de vacas que sofriam de mastite estafilocócica. Dack *et al.* (apud BAIRD-PARKER, 1990) foram os primeiros a demonstrar que a intoxicação alimentar estafilocócica era causada por uma toxina filtrável, mais tarde chamada enterotoxina.

O gênero *Staphylococcus* tem pelo menos 33 espécies, 17 das quais podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (KONEMAN *et al.*, 2001). As três espécies de maior

importância clínica são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*. De acordo com a edição de 1986 do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, somente as espécies *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e algumas cepas de *S. hyicus* são coagulase-positiva. Entre os estafilococos coagulase-negativa estão *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* e *S. saccharolyticus*.

*Staphylococcus aureus* é o principal representante dos estafilococos coagulase-positiva, sendo considerado um importante patógeno para humanos e animais. A maioria dos indivíduos já apresentou ou vai apresentar algum tipo de infecção ou intoxicação por *Staphylococcus aureus* durante a sua vida, cuja gravidade vai desde uma intoxicação alimentar ou infecção cutânea de pouca importância até infecções graves potencialmente fatais (NASCIMENTO, CORBIA & NASCIMENTO, 2001)

Os estafilococos coagulase-negativa são membros da microbiota humana normal e, algumas vezes causam infecções, sobretudo em pacientes muito jovens, idosos e imunocomprometidos. Os tipos de infecções associadas aos estafilococos coagulase-negativos incluem: 1. infecções urinárias, nosocomiais e adquiridas na comunidade; 2. infecções associadas a dispositivos permanentes (válvulas cardíacas protéticas, cateteres endovenosos, próteses articulares, implantes de bombas intratecais, derivações para hemodiálise e cerebrospinais, marcapassos, cateteres para diálise peritonial); 3. bacteremia em hospedeiros comprometidos (prematturos, pacientes com doenças neoplásicas ou cardiovasculares, com processos hematológicos malignos, queimados, com traumatismos, receptores de transplante, pacientes com alterações congênitas); 4. endocardite de válvulas cardíacas naturais e protéticas; 5. Osteomielite (infecção de ferida cirúrgica, infecção associada com prótese e com traumatismo) e 6. endoftalmite pós-cirúrgica (KONEMAN *et al.*, 2001).

Cerca de 75% dessas infecções causadas por estafilococos coagulase-negativa ocorrem devido a *Staphylococcus epidermidis*. As infecções causadas por *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hominis* e por outras espécies são menos comuns (LIVERMORE, 2000).

### 1.2.1 Morfologia e Identificação

Os estafilococos são células esféricas com diâmetro de cerca de 1µm, dispostos em cachos irregulares. Observa-se também a presença de cocos isolados, aos pares, em tetrades e em cadeias em culturas líquidas. As células bacterianas quando jovens são fortemente Gram-positivas; com o envelhecimento, muitas se tornam Gram-negativas. Os

estafilococos são imóveis e não formam esporos. Sob a influência de fármacos como a penicilina, os estafilococos sofrem lise (JAWETZ, MELNICK & ADELBERG, 1998).

Os estafilococos crescem rapidamente na maioria dos meios bacteriológicos em condições aeróbias ou anaeróbias. Crescem mais rapidamente a 37°C, mas formam melhor seu pigmento em temperatura ambiente (20-25°C). As colônias, em meios sólidos, são circulares, lisas, elevadas e brilhantes. Em geral, *S. aureus* forma colônias acinzentadas e amarelo-dourado intenso. As colônias de *S. epidermidis* geralmente exibem coloração cinza a branca no isolamento primário; muitas colônias apresentam pigmento apenas após incubação prolongada. Nenhum pigmento é produzido em condições anaeróbias ou em caldo. Verifica-se a produção de vários graus de hemólise por *S. aureus* e, em certas ocasiões, por outras espécies (JAWETZ, MELNICK & ADELBERG, 1998).

Os estafilococos produzem catalase, que os diferencia dos estreptococos. Os estafilococos fermentam lentamente muitos carboidratos, produzindo ácido láctico, mas não gás. A atividade proteolítica varia acentuadamente de uma cepa para outra. Os estafilococos patogênicos produzem muitas substâncias extracelulares. Eles são relativamente resistentes ao ressecamento, ao calor (suportam 50°C durante 30 minutos) e ao cloreto de sódio a 9%, mas são rapidamente inibidos por determinadas substâncias químicas, como, por exemplo, hexaclorofeno a 3% (JAWETZ, MELNICK & ADELBERG, 1998).

A prevalência de resistência estafilocócica aos agentes antimicrobianos é assustadoramente alta e ainda continua aumentando. Conseqüentemente, o desenvolvimento de testes simples e rápidos de diagnóstico que poderão identificar espécies de estafilococos e determinar seu perfil de resistência poderá ser um importante progresso no diagnóstico dessas infecções (MEHROTRA, WANG & JOHNSON, 2000).

O sucesso terapêutico dos antibióticos depende do seu uso adequado. Vários tipos de erros foram e continuam sendo cometidos no emprego destes fármacos, resultando na ineficácia de muitos deles. O reconhecimento desses erros levou ao estabelecimento de algumas normas para o uso de antibióticos, como o conhecimento da sensibilidade dos microrganismos frente aos seus principais grupos. Esses fármacos têm sido utilizados de maneira indiscriminada, no setor agrícola, tanto para fins terapêuticos, principalmente no tratamento de mastites bovinas, como incorporados à alimentação animal, como suplemento dietético. Tais procedimentos estão conduzindo à presença de níveis elevados de resíduos de antibióticos no leite, constituindo-se em sério problema na área econômica e de Saúde Pública (CORBIA *et al*, 2000). Entre os problemas ocasionados por seus resíduos, destaca-se o aparecimento de cepas resistentes, mesmo as não patogênicas,

levando-se em conta a possibilidade de transferência dessa resistência para cepas patogênicas, através de mecanismos genéticos como o de conjugação bacteriana (MULLIGAN *et al*, 1993).

### 1.2.2 *Staphylococcus aureus*

A espécie *Staphylococcus aureus* é a que está associada mais freqüentemente às doenças estafilocócicas, quer sejam de origem alimentar ou não. As cepas de *S. aureus* são sensíveis a uma série de bacteriófagos, o que auxilia no estudo de surtos de intoxicação, levando muitas vezes à fonte da infecção (FRANCO & LANDGRAF, 2004).

*S. aureus* está presente nas narinas, na pele e pêlos de animais de sangue quente, sendo que 30-50% da população humana são portadores desta bactéria (LE LOIR, BARON & GAUTIER, 2003). Os homens e os animais são os principais reservatórios. A cavidade nasal é o principal habitat dos estafilococos no homem e, a partir deste foco, atingem tanto a epiderme e feridas como o ar, água, solo, leite, esgoto e qualquer superfície ou objeto que tenha entrado em contato com o homem (FRANCO & LANDGRAF, 2004).

Além do homem, a maioria dos animais domésticos também é portadora ou apresenta-se contaminada pela bactéria. Exemplo típico é a mastite estafilocócica do gado leiteiro. Caso o leite infectado seja consumido ou utilizado no preparo de queijos, haverá chances de ocorrer intoxicação.

*S. aureus* são bactérias mesófilas apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7°C a 47,8°C; as enterotoxinas são produzidas entre 10°C e 46°C, com temperatura ótima entre 40°C e 45°C. Os extremos de temperatura estão na dependência dos demais parâmetros que devem encontrar-se em condições ótimas. Os surtos de intoxicação alimentar são provocados por alimentos que permaneceram neste intervalo de temperatura por tempo variável, de acordo com o nível de inóculo e temperatura de incubação. Em geral, quanto mais baixa for a temperatura, maior será o tempo necessário para a produção de enterotoxina (FRANCO & LANDGRAF, 2004).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são tolerantes a concentrações de 10 a 20% de NaCl e a nitratos, o que torna os alimentos curados veículos potenciais para as mesmas. Em relação ao pH, *S. aureus* cresce na faixa de 4 a 9,8, com ponto ótimo entre 6 e 7,0. Considerando a atividade de água (Aa), os estafilococos são únicos em sua capacidade de crescerem em valores inferiores aos normalmente considerados mínimos para as bactérias não-halófilas. O valor mínimo da Aa considerado, atualmente, é de 0,86 apesar de, sob

condições ideais, esta bactéria já ter se desenvolvido em Aa de 0,83 (FRANCO & LANDGRAF, 2004).

*S. aureus* se diferenciam das outras espécies estafilocócicas através da combinação dos seguintes fatores: características morfotintoriais, produção de coagulase, termonuclease, acetoina, beta-galactosidase, fosfatase e alfa-toxina (hemólise), produção de ácidos a partir do manitol, maltose, xilose, sacarose e da trealose, sensibilidade a novobiocina, sensibilidade a lisostafina, presença de ribitol no ácido teicóico e proteína A e fator de aglutinação na parede celular (LANCETTE & TATINI, 1992). A lisostafina é uma endopeptidase que rompe as ligações cruzadas dos pentapeptídeos ricos em glicina do glicopeptídeo da parede celular dos estafilococos. Esta atividade torna as células sensíveis à lise osmótica (KONEMAN *et al.*, 2001).

A característica isolada mais confiável para identificar *S. aureus* é determinada pela prova de coagulase. A prova de coagulase convencional pode ser realizada mediante procedimento em lâmina ou em tubo. A coagulase é uma enzima que coagula o plasma humano e de outras espécies animais. Diferenças entre a susceptibilidade dos plasmas de várias espécies já foi demonstrada, sendo que para o teste de coagulase, os plasmas humano e de coelho são os mais utilizados. A produção de coagulase pelos *S. aureus* pode ser afetada adversamente por fatores físicos, como as condições de armazenamento, pH do meio e o dessecamento (LANCETTE & TATINI, 1992).

A presença do fator de aglutinação nas células é uma característica única dos *S. aureus*. Este teste pode ser utilizado para distinguir *S. aureus* coagulase-positiva de outras espécies também coagulase-positiva como *S. hyicus*. O fator de aglutinação, presente nas células dos *S. aureus*, liga-se ao fibrinogênio ou à fibrina presente no plasma humano ou de coelho, resultando na aglutinação das células. O agrupamento das células é rápido (menos de 2 minutos) e os resultados são mais nítidos do que os coágulos 1+ e 2+ dos testes de coagulase (LANCETTE & TATINI, 1992).

A termonuclease também é freqüentemente utilizada como um teste simples, rápido e prático para a identificação de rotina de *S. aureus*. Todavia, o uso dos testes de coagulase e termonuclease podem resultar em resultados falso-negativos na designação das espécies, visto que duas outras espécies, *S. intermedius* e *S. hyicus*, são ambos coagulase e termonuclease positivos. Devido aos motivos expostos, surge a necessidade de confirmação através de outros testes (LANCETTE & TATINI, 1992).

Os meios de cultura empregam várias substâncias químicas, que são inibidores para o crescimento de espécies competitivas com *S. aureus*. As duas substâncias seletivas tóxicas mais freqüentemente utilizadas em meios de isolamento de estafilococos são o cloreto de

sódio (NaCl) e o telurito de potássio ( $K_2TeO_3$ ). Várias concentrações desses agentes têm sido utilizadas, variando de 5,5% a 10% de NaCl e de 0,0025% a 0,05% de  $K_2TeO_3$ . Outras substâncias químicas como o sulfato de amônia, o ácido sórbico, a glicina, o cloreto de lítio e a polimixina são freqüentemente combinados com o NaCl e o  $K_2TeO_3$  (LANCETTE & TATINI, 1992).

As principais características do meio de isolamento incluem: (a) a capacidade de *S. aureus* crescer na presença de 7,5 a 10% de NaCl; (b) a capacidade de crescer na presença de 0,01% a 0,05% de  $K_2TeO_3$  em combinação com 0,2% ou 0,5% de cloreto de lítio, e de 0,12% a 1,26% de glicina, ou 40 µg/ml de polimixina; (c) a habilidade do *S. aureus* reduzir o  $K_2TeO_3$ , produzindo colônias negras, aerobicamente; (d) a forma, a aparência e o tamanho das colônias; (e) a pigmentação das colônias; (f) a atividade de coagulase e de produção de ácidos em meios sólidos; (g) a habilidade do *S. aureus* hidrolisar a lecitina de gema de ovo; (h) a produção de fosfatase; (i) a produção de termonuclease; (j) crescimento a 42 a 43°C em meios seletivos (LANCETTE & TATINI, 1992).

Vários meios comuns e seletivo-indicadores, entre os quais se inclui o ágar manitol-salgado e o ágar Baird-Parker, no caso de amostras de alimentos, podem ser empregados no isolamento dos *S. aureus*. No Ágar Baird-Parker as colônias típicas são circulares, lisas, úmidas, de coloração cinza escuro a negro, rodeadas ou não por halo transparente, duplo ou opaco.

Nascimento, Corbia e Nascimento (2001) relataram as limitações da técnica de isolamento e enumeração de *S. aureus*. Eles verificaram que além das variantes de *Staphylococcus* coagulase-positiva, também existem limitações na identificação visual das colônias em meio de isolamento, evidenciadas no decorrer do isolamento e da enumeração de *Staphylococcus* spp. coagulase-positiva, em queijos minas frescal, e alertaram para a necessidade de aplicação de testes bioquímicos subseqüentes, para viabilizar os critérios de diagnóstico. Do total de 59 amostras de queijo minas frescal examinadas eles isolaram 18 colônias de *S. aureus*, 25 colônias de *Staphylococcus* spp. coagulase-positiva, 93 colônias de *Micrococcus* spp., 64 de *Streptococcus* spp. e quatro colônias de leveduras. Na maioria das placas com crescimento de colônias típicas (pretas, brilhantes), houve diferenças em relação à presença/ausência de halo, variação de tamanho do próprio halo que, em algumas vezes, parecia que a colônia era circundada por dois halos, além das diferenças de tamanho de colônias. Tais diferenças algumas vezes foram confirmadas por testes bioquímicos evidenciando a presença de bactérias diferentes. Porém, em alguns casos, foi constatado que colônias com e sem a formação de halo, após isolamento e identificação bioquímica, foram consideradas colônias de *S. aureus*. Dessa maneira, eles constataram que o critério

diagnóstico de contagem em placa padronizado, usado pela visualização da presença de halo ao redor das colônias negras é passível de falhas e, por isso, não deve ser considerado o único indicador de *S. aureus*. Outra observação feita por estes autores foi em relação à tonalidade das colônias, pretas nos meios tradicionais de isolamento de amostras de alimentos traduzidas pela habilidade da bactéria de reduzir o componente seletivo telurito de potássio, presente em Ágar Baird-Parker e em Ágar Voges-Johnson. A presença de colônias pretas não ficou restrita às bactérias isoladas dos queijos analisados, visto que, constatou-se também a presença de algumas leveduras, com características típicas de *S. aureus*.

As técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase – PCR e a Multiplex PCR, também são utilizadas para detectar *S. aureus*. Brakstad, Aasbakk e Maeland (1992) desenvolveram um protocolo de PCR para amplificar a sequência do gene *nuc*, que codifica uma endonuclease termoestável produzida pelo *S. aureus*. Wang, Cao e Cerniglia (1997) desenvolveram um protocolo universal de PCR para detecção de 13 espécies de patógenos alimentares, dentre eles, o *S. aureus*.

*S. aureus* produz uma grande variedade de exoproteínas que contribuem para sua habilidade de colonizar e causar doenças nos hospedeiros. Todas as cepas secretam um grupo de enzimas e citotoxinas que incluem quatro hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e coagulase. A principal função destas proteínas é converter tecido local do hospedeiro em nutrientes requeridos para o crescimento bacteriano. Algumas cepas produzem exoproteínas adicionais, que incluem a Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico – TSST-1, as toxinas esfoliativas Eta e Etb, que causam a Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada e as enterotoxinas A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N e O (BALABAN & RASOOLY, 2000; BLAIOTTA *et al.*, 2004).

A intoxicação alimentar causada pelo *S. aureus* se dá logo após a ingestão do alimento contaminado com a toxina pré-formada. A ingestão de apenas um micrograma é suficiente para causar os sintomas característicos da intoxicação alimentar, e calcula-se que cerca de  $10^5$  células de *S. aureus* por grama de alimento são necessários para produzir enterotoxina (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1998). Segundo Jablonski e Bohach (2001) as enterotoxinas não podem ser detectadas em laboratório até que se alcance uma contagem de  $10^6$  UFC/g de alimento. Em 1998, Meyrand *et al.* detectaram a enterotoxina estafilocócica A em  $10^3$  UFC/g (em meio enriquecido a 37°C).

Os sinais e sintomas são caracterizados por náusea, vômito, diarreia, dores abdominais, sudorese e, eventualmente, dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial, prostração

e, raríssimas vezes, febre, quando a quantidade de toxina ingerida é grande (NASCIMENTO, CORBIA & NASCIMENTO, 2001; FRANCO & LANDGRAF, 2004).

Os alimentos comuns da intoxicação alimentar estafilocócica são o leite, cremes, tortas recheadas com creme, entre outros. A contaminação de queijos também já causou vários surtos tanto antes como depois do advento do emprego do leite pasteurizado na sua fabricação. Neste último caso, pode ocorrer contaminação pós-processamento ou utilização de fermentos contaminados por *S. aureus*.

De Luca, Zanetti e Stampi (1997) avaliaram a contaminação de produtos laticínios vendidos em Bologna, Itália com *S. aureus* e bactérias do gênero *Staphylococcus*. *S. aureus* foi encontrado em 16,30% das amostras de 135 queijos examinados: 8,3% em *soft cheese*, 17,6% em *blue cheese*, 18,9% em *semi soft-cheese* e 25% em queijo mussarela.

Toshkova *et al.* (2001) desenvolveram um estudo para investigar a significância e a relação entre o estado de portador de *S. aureus* nas cavidades nasais e as infecções cutâneas estafilocócicas. Trinta e uma amostras, isoladas de 12 pacientes com infecções cutâneas crônicas e recorrentes, um paciente com septicemia e um paciente com otite externa foram estudadas. Os seus resultados mostraram que há uma identidade entre os *S. aureus* obtidos das cavidades nasais anteriores e nas infecções cutâneas de cada paciente, indicando para a importância do estado de portador dessas bactérias para o desenvolvimento destas infecções.

Vautor *et al.* (2003) investigaram a diversidade genética de 179 isolados de *S. aureus* obtidos de vários pontos de 10 fazendas produtoras de queijos fabricados com leite de ovelha cru. Os isolados foram coletados de queijos artesanais, dos tanques utilizados como reservatórios do leite, dos úberes, de abscessos cutâneos nos úberes, quando presentes, das mãos e cavidades nasais anteriores dos fazendeiros e do ar da área de ordenha. Os isolados foram tipificados através da técnica de Eletroforese em Campo Pulsado – *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE) e comparados com outros isolados de *S. aureus* oriundos de diferentes hospedeiros em diferentes locais. Os resultados mostraram que nove fazendas estavam contaminadas por isolados de *S. aureus* com os mesmos padrões genéticos ou com padrões relacionados. Também foi verificado que havia um único clone de *S. aureus* amplamente disseminado tanto nas glândulas mamárias infectadas quanto nos queijos produzidos com o leite cru, o que confirmou que estas infecções são a principal fonte de contaminação de produtos laticínios fabricados com leite de ovelha.

Em 2005 Vautor *et al.* avaliaram a prevalência de portadores nasais *S. aureus* nas fábricas de laticínios das fazendas produtoras de queijos com leite de ovelha cru. O estudo mostrou que 29% das ovelhas eram portadoras de *S. aureus* em suas cavidades nasais. A

diversidade genética dos 136 isolados obtidos das cavidades nasais das ovelhas, do ambiente da área de ordenha e dos queijos foi investigada também pela técnica de PFGE. Os resultados sugeriram uma continuidade entre os isolados oriundos das cavidades nasais com os isolados nos outros locais.

### 1.2.3 *Enterotoxinas produzidas por Staphylococcus aureus*

As cepas de *Staphylococcus aureus* produzem uma variedade de toxinas extracelulares, incluindo as enterotoxinas (SEs), a toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), a toxina esfoliativa (Eta e Etb). A Síndrome do Choque Tóxico de humanos e animais é causada pela presença de *S. aureus* que produzem TSST-1. As enterotoxinas, assim como TSST-1, pertencem à família dos superantígenos (MEHROTRA, WANG & JOHNSON, 2000).

As enterotoxinas são um grupo de proteínas simples, com baixo peso molecular – 26.000 a 30.000 daltons, que são produzidas durante todas as fases do crescimento bacteriano, mas principalmente durante a metade e o fim da fase exponencial (SORIANO *et al.*, 2002). Elas são nomeadas com as letras alfabéticas de acordo com a ordem cronológica de suas descobertas.

Até o presente momento, 18 enterotoxinas distintas têm sido purificadas: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEM, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU (BALABAN & RASOOLY, 2000; GENIGEORGIS, 1989; JABLONSKI & BOHACH, 2001; JARRAUD *et al.*, 2001; KURODA *et al.*, 2001; ORWIN *et al.*, 2001, 2003; LETERTRE *et al.*, 2003; OMOE *et al.*, 2003). Além disso, para SEC, SEG, SEI e SEU já têm sido reportadas algumas variantes (MARR *et al.*, 1993; ABE *et al.*, 2000; OMOE *et al.*, 2002; LETERTRE *et al.*, 2003). A relação entre estas novas enterotoxinas e a intoxicação alimentar humana não é completamente entendida até o presente momento. Existem poucos estudos a respeito da incidência dos genes que codificam estas novas enterotoxinas, e eles consideram principalmente amostras clínicas ou de coleções bacterianas (JARRAUD *et al.*, 1999; MONDAY & BOHACH, 1999; ABE *et al.*, 2000; LARSEN *et al.*, 2000; OMOE *et al.*, 2002; BECKER *et al.*, 2003). Pouco se tem relatado sobre a detecção das novas enterotoxinas em *S. aureus* isolados de alimentos (McLAUHLIN *et al.*, 2000; AKINEDEN *et al.*, 2001; ROSEC, GIGAUD, 2002). Ao contrário disso, muitos estudos avaliaram a ocorrência das cinco enterotoxinas clássicas (SEA a SEE) em cepas estafilocócicas de origem alimentar e/ou diretamente de amostras de alimentos (De LUCA, ZANETTI & STAMPI, 1997; ROSEC *et al.*, 1997; MEYRAND

*et al.*, 1998; RASOOLY & RASOOLY, 1998; GONZALES-FANDOS *et al.*, 1999; McLAUHLIN *et al.*, 2000; AKINEDEN *et al.*, 2001; ATANOSSAVA *et al.*, 2001; BALABAN, RASOOLY, 2001; FUEYO *et al.*, 2001; TAMARAPU, McKILLIP & DRAKE., 2001; TONG-RONG *et al.*, 2001; HOLECKOVA *et al.*, 2002; ROSEC & GIGAUD, 2002; ERCOLINI *et al.*, 2004). Suas cadeias polipeptídicas apresentam quantidades apreciáveis de lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e tirosina. A composição de aminoácidos das enterotoxinas A, D e E é similar, o mesmo ocorrendo entre a B e a C. O seqüenciamento parcial de aminoácidos das enterotoxinas A, B e C mostrou a existência de uma região homóloga nas três moléculas, o que sugere ser esta região o sítio ativo da molécula de enterotoxina (FRANCO & LANDGRAF, 2004).

As enterotoxinas são similares em sua composição e atividade biológica, mas são identificadas separadamente devido às suas diferenças antigênicas. Várias SEs sorologicamente distintas têm sido reconhecidas e classificadas de A a U, e seus genes como *sea* a *seu*. A toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico foi equivocadamente designada SEF e por isto não existe a enterotoxina sorotipo F. Pequenas variações antigênicas da SEC (SEC<sub>1,2,3</sub>) têm sido descritas assim como duas SEH distintas. Isto não é incomum para cepas que secretam mais de uma enterotoxina (FUEYO *et al.*, 2001).

Elas são higroscópicas e facilmente solúveis em água e soluções salinas. Apresentam ponto isoelétrico entre 7,0 e 8,6, pico de absorbância a 277nm e são resistentes a tripsina, quimiotripsina, renina, papaína e pepsina, com exceção da enterotoxina B que é destruída pela pepsina, em valores de pH ao redor de 2 (BERGDOLL, 1983; LE LOIR, BARON & GAUTIER, 2003).

As enterotoxinas são termorresistentes, o que é especialmente importante para a indústria de alimentos, porque a maioria dos alimentos processados sofre algum tratamento térmico durante o processamento. Por exemplo, a pasteurização do leite destruirá o microrganismo – *S. aureus* – mas não inativará a toxina, caso já esteja presente (FRANCO & LANDGRAF, 2004). Porém, elas podem ser inativadas por tratamento térmico utilizado na esterilização de alimentos enlatados quando estão presentes em baixas concentrações (BERGDOLL, 1983). Schwabe *et al.* (1990) mostraram que a inativação térmica de SEA, SEB e SEC varia de acordo com a matriz alimentar e o pH. Sendo assim, é muito difícil calcular o impacto de tratamento térmico na atividade das enterotoxinas, visto que, isto depende do tipo e da concentração de enterotoxina e da matriz alimentar. Além disso, em alguns casos, a inativação térmica é espontaneamente reversível pelo tratamento com pH alcalino ou com uréia (BENNET, 1992). Estes dados mostram que as enterotoxinas

resistem a condições (tratamento térmico, baixo pH) que destruiriam facilmente a bactéria que as produziu.

Segundo Franco & Landgraf (2004) as enterotoxinas apresentam várias ações, entre elas:

- ❖ Ação emética: é a reação mais frequentemente observada neste tipo de intoxicação. Os sítios desta ação parecem localizar-se no intestino. Este estímulo é transferido através do nervo vago ao centro do vômito, que faz parte do sistema nervoso central (SNC). O centro do vômito induz, de alguma maneira, a retroperistalsia do estômago e do intestino delgado provocando o vômito. Por esta razão, as toxinas estafilocócicas deveriam ser denominadas neurotoxinas e não enterotoxinas.
- ❖ Ação diarreica: a diarreia é o segundo sintoma mais comum na intoxicação alimentar estafilocócica. O mecanismo de ação ainda não está perfeitamente elucidado porque, aparentemente, é diferente de outras diarreias, como, por exemplo, as provocadas por *Clostridium perfringens* e por *Bacillus cereus*. Nestes dois casos, as toxinas provocam uma dilatação na alça de intestino de coelho, enquanto que as estafilocócicas não o fazem. Uma provável explicação é a ativação de um mecanismo secretor de Na e Cl. Além disso, caso uma quantidade suficiente de enterotoxina esteja presente no alimento, ela causará inflamação e irritação da mucosa do estômago e intestino delgado.
- ❖ Atividade de superantígenos: as enterotoxinas estafilocócicas pertencem a uma grande família das toxinas estafilocócicas e estreptocócicas pirogênicas, que compartilham relações filogenéticas, estrutura, função e seqüência homóloga. Estas toxinas pirogênicas causam síndromes como a Síndrome do Choque Tóxico e estão envolvidas nas intoxicações alimentares (BALABAN & RASOOLY, 2000). Elas apresentam atividades biológicas comuns como a imunossupressão e o estímulo a proliferação de células T não específicas. Estas atividades são referidas como atividade de superantígenos.

A atividade de superantígeno resulta da interação direta das enterotoxinas com as células T receptoras de antígenos (TCR) e com o Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC), classe II, das células apresentadoras de antígenos (APC). Esta interação leva a ativação e proliferação das células T não-específicas e na secreção de interleucinas que podem estar envolvidas nos mecanismos de toxicidade das enterotoxinas (LE LOIR, BARON & GAUTIER, 2003).

As primeiras seqüências de todas as SEs clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) têm sido estudadas com o seqüenciamento das proteínas e com a tecnologia do DNA

recombinante (BALABAN & RASOOLY, 2000). A quantidade de enterotoxina necessária para produzir doença depende da susceptibilidade do indivíduo a enterotoxina, peso e especialmente da saúde da pessoa afetada (JABLONSKI & BOHACH, 2001).

A quantidade de enterotoxina necessária para causar intoxicação é muito pequena. A dose emética em testes feitos com macacos foi de ~5-20 µg/animal (BERGDOLL, 1983). A dose mínima de SEA necessária para causar doença em escolares foi  $144 \pm 50$  ng, de acordo com o que foi documentado por Evenson *et al.* (1988). Intoxicação causada pela SEB exibe sintomas mais severos do que a causada pela SEA, porém, SEB é menos comum (JABLONSKI & BOHACH, 2001).

SEA é a enterotoxina mais comum detectada em surtos de intoxicação alimentar nos EUA, seguida da SED e da SEB. O gene que a codifica, *sea*, é carregado por um bacteriófago (BETLEY & MEKALANOS, 1985; BORST & BETLEY, 1994). SEA é produzida na fase exponencial do crescimento, e não é regulada pelo gene acessório *agr*, ao contrário dos genes *seb*, *sec* e *sed*, que requerem um *agr* funcional para sua expressão máxima.

O gene que codifica a SEB, *seb*, é um gene cromossomal isolado de amostras clínicas e de casos de intoxicação alimentar. Todavia, em outras cepas bacterianas, o gene é carregado por plasmídio (BALABAN & RASOOLY, 2000).

As SECs são um grupo de proteínas altamente conservadas. Existem três subtipos antigenicamente distintos de SECs; SEC1, SEC2 e SEC3. A SEC bovina é codificada por um gene localizado em uma ilha de patogenicidade. SED é o segundo sorotipo mais comum associado com intoxicação alimentar. O gene *sed*, que a codifica, está localizado em um plasmídio designado pIB485. SEE compartilha alta homologia (81%) com SEA e seu gene é carregado por um fago incompleto (BALABAN & RASOOLY, 2000).

A produção de enterotoxinas por estafilococos coagulase-negativa ou por *S. intermedius* e *S. hyicus* foi extensamente estudada no passado (HIROOKA *et al.*, 1988; JAULHAC *et al.*, 1992; KHAMBATY, BENNET & SHAH., 1994; RODRIGUEZ *et al.*, 1996; VERNOZY-ROZAND *et al.*, 1996; ROSEC *et al.*, 1997; UDO *et al.*, 1999; BECKER *et al.*, 2001; SORIANO *et al.*, 2002). Os resultados de alguns desses estudos sugeriram que os estafilococos coagulase-negativa (RODRIGUEZ *et al.*, 1996; VERNOZY-ROZAND *et al.*, 1996; UDO *et al.*, 1999) e *S. intermedius* (KHAMBATY *et al.*, 1994) podem ser potencialmente envolvidos na intoxicação alimentar.

Entre as amostras isoladas de alimentos, 25% das cepas são enterotoxigênicas (BERGDOLL, 1989), todavia, as estimativas variam consideravelmente de um alimento para outro e de um caso para outro. Na França, de 61 amostras isoladas de queijo

produzido a partir de leite cru, 15,9% eram enterotoxigênicas (ROSEC *et al.*, 1997). Na Dinamarca, outro estudo executado com amostras isoladas de vacas com mastite, detectou somente um isolado de 414 isolados de *Staphylococcus aureus* carreando o gene de enterotoxinas (LARSEN *et al.*, 2000). Um estudo similar foi desenvolvido em Minas Gerais, onde 54 (43%) de 127 *S. aureus* isolados de vacas com mastite eram produtores de enterotoxinas (CARDOSO *et al.*, 1999).

Dos surtos de doenças alimentares relatados, 66% na Inglaterra e no País de Gales, quase 48% no México e 86% no Egito são atribuídos ao *S. aureus*. Uma estimativa da contagem de estafilococos em surtos de doenças de origem alimentar foi de 5, 8, 10, 30, 15 e 24% do total de doenças de origem alimentar na Holanda, USA, Finlândia, França, Coréia e Japão, respectivamente. Cerca de 9 e 19% dos incidentes de intoxicação alimentar estafilocócica na Inglaterra e nos USA, respectivamente, ocorreram em restaurantes (SORIANO *et al.*, 2002).

Rosec *et al.* (1997) isolaram 213 cepas de *S. aureus* e 51 cepas de outros estafilococos de 121 gêneros alimentícios, entre eles, queijos preparados com leite cru, queijos preparados com leite de cabra e ovelha, tortas, refeições cozidas, carne de porco cozida e crua, sorvetes, pedaços de carne e semolina de milho. Dos *S. aureus* isolados 30,5 % produziram ao menos uma ou mais das cinco enterotoxinas estafilocócicas mais conhecidas, enquanto as cepas coagulase-negativas não produziram nenhuma delas. Cepas originadas de biovar humano foram as mais enterotoxigênicas e a enterotoxina C foi o tipo mais detectado.

Akineden *et al.* (2001) isolaram 103 cepas de *Staphylococcus aureus* de amostras de leite produzidas por 60 vacas com mastite oriundas de oito fazendas diferentes localizadas em uma região da Alemanha. Todos os isolados foram identificados como *S. aureus* com bases nas características das culturas, nas propriedades hemolíticas e nos testes de coagulase. Tais resultados foram confirmados com a amplificação pela PCR do gene que codifica o 23S rRNA, característico deste microrganismo. Todos os isolados apresentaram os genes que codificam para a enzima coagulase e para o fator de aglutinação. Pela PCR foram detectados os genes que codificam a toxina estafilocócica TSST-1 e para as enterotoxinas SEA, SEC, SED, SEG, SEI, e SEJ.

Blaiotta *et al.* (2004) avaliaram a ocorrência das enterotoxinas estafilocócicas mais conhecidas e do gene TSST-1 (toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico) em cepas estafilocócicas coagulase-positiva e coagulase-negativa isoladas de carne e de produtos laticínios. De 109 cepas selvagens de *Staphylococcus spp.* analisadas, somente 11 cepas de

*S. aureus* foram positivas para enterotoxinas (SEG, SEI, SEM, SEN e SEO) e para TSST-1 na PCR.

Normanno *et al.* (2005) investigaram a presença de estafilococos coagulase-positiva e *S. aureus* em vários produtos alimentícios comercializados em mercados da Itália e em “swabs” de superfícies de contacto com alimentos das indústrias alimentícias. Um total de 11.384 amostras foi analisado e 1971 delas (17,3%) continham estafilococos coagulase-positiva. Os testes realizados em 541 cepas coagulase-positivas levaram a identificação de 537 *S. aureus* cuja capacidade de produção de enterotoxinas tipos A, B, C e D foi avaliada. Um total de 298 cepas de *S. aureus* (55,5%) produziu uma ou mais enterotoxinas: 33,9% produziram SEC, 26,5% SEA, 20,5% SEA + SED, 13,4% SED, 2,7% SEB, 1,7% SEA + SEB, 0,7% SEC + SED e 0,3% produziram SEA + SEC e SEB + SEC.

Kitai *et al.* (2005) examinaram 444 amostras de frango cru vendidas em 145 supermercados diferentes para avaliar a contaminação com *S. aureus* e sua enterotoxigenicidade. *S. aureus* foi isolado de 292 amostras, sendo que cerca de 80% dos 714 isolados pertenciam aos biotipos de aves domésticas (57,1%) e de humanos (22,1%). Setenta e oito (21,7%) de 360 isolados foram enterotoxigênicos e isolados de 78 amostras de 53 supermercados. As enterotoxinas estafilocócicas produzidas foram: SEB (50 isolados), SEA (14), SEC (8), SED (2), SEA + SEB (2) e SEA + SEC (2).

#### 1.2.4 *FemA*

A resistência de *S. aureus* a meticilina e a outros  $\beta$ -lactâmicos é atribuída a presença do gene *mecA*, cujo produto é uma proteína de 78-kDa chamada *penicillin binding protein 2a* (PBP2a) (MEHROTRA, WANG & JOHNSON, 2000). Através de uma série de estudos genéticos, vários outros genes foram identificados como fatores envolvidos na resistência a meticilina. Estes fatores, conhecidos como gene *fem* (*factors essential for methicillin resistance*) ou gene *aux* (*auxiliary*), estão diretamente envolvidos na biossíntese da parede celular bacteriana ou na síntese de fatores associados, além de influenciar o nível de resistência a meticilina. Ao contrário do gene *mecA*, os genes *fem* ou *aux* estão presentes tanto em cepas estafilocócicas resistentes a meticilina quanto naquelas que são susceptíveis a esta droga. Três desses genes, *femX* (ou *FmhB*), *femA* e *femB*, desempenham um papel vital nos estágios posteriores à síntese de peptideoglicano da parede celular dos estafilococos e, por essa razão, podem servir como alvos apropriados para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos (BENSON *et al.*, 2002).

Nos *S. aureus*, o estágio posterior a biossíntese do peptidoglicano envolve a construção de filamentos de pentaglicina no grupo  $\epsilon$  amino ao lado da cadeia de lisina. Estes filamentos constituem as pontes interpeptídicas. Neste microrganismo a responsável por esta construção é a família de enzimas FemXAB, onde FemX é responsável pela adição da primeira glicina no grupo  $\epsilon$  amino ao lado da cadeia de lisina; FemA é responsável pela adição dos dois próximos resíduos de glicina e FemB pelos dois últimos resíduos de glicina. A cadeia estendida Lisina-Glicina<sub>5</sub> nos estafilococos servem como pontes entre os peptídeos durante os estágios finais da transpeptidação que é catalizada pelas PBPs. Esta ligação transversal entre os filamentos de peptídeos é fundamental para a manutenção da estabilidade da parede celular bacteriana durante variações de pressão osmótica (BENSON *et al.*, 2002).

Estudos bioquímicos têm mostrado que a inativação do *femA* nos *S. aureus* resulta em alterações na composição da parede celular (JOHNSON, KRÜGER & LABISCHINSKI, 1995). Além disso, genes mutantes de *femA* também mostraram uma leve redução na razão de crescimento, diminuição da atividade de autólise e do *turnover* da parede celular, e menor susceptibilidade para a atividade de endoglicinase da lisostafina. (MAIDHOF *et al.*, 1991).

Kizaki, Kobayashi e Ikeda (1994) analisaram 45 amostras de estafilococos isolados de sangue utilizando a técnica de detecção enzimática da reação em cadeia da polimerase - ED-PCR. Das 45 amostras, o ED-PCR detectou o gene *femA* em 34 amostras. Análises fenotípicas mostraram que estas 34 amostras (*femA* positivas) eram todas *S. aureus* e que as outras 11 amostras (*femA* negativas) eram *S. epidermidis*. Estes resultados foram completamente consistentes com os resultados da detecção de *femA* usando as técnicas de PCR padrão e subsequente hibridização com *Southern Blot*. No PCR padrão, o gene *femA* foi detectado tanto nos *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA) quanto nos *S. aureus* sensíveis a meticilina (MSSA) e foi ausente para todas as amostras de *S. epidermidis*.

A detecção dos genes *femA* e *mecA* tem sido explorada através da técnica de Multiplex PCR para a identificação de MRSA. Vários testes moleculares desenhados para detectar *femA* em *S. aureus* falharam na amplificação de sua seqüência homóloga nos estafilococos coagulase-negativa (CNS), mas há evidências da presença de um gene estruturalmente relacionado com o *femA* dos *S. aureus* em *S. epidermidis*. Estes dados foram confirmados através da completa identificação e sequenciamento do *Open Reading Frame* – ORF – dos genes *femA* e *femB* em *S. epidermidis* e *S. simulans* (dados originários do Gene Bank). Ao contrário da aproximada identidade dos genes *mecA* em *S. aureus* e nas cepas CNS, os genes *femA* e *femB* dos *S. aureus* e dos *S. epidermidis* exibem aproximadamente 20-22%

de divergência, o que não ocorre com o arranjo genômico do operon *femA-femB* dos *S. epidermidis* que é aproximadamente idêntico ao encontrado nos *S. aureus* (VANNUFFEL *et al.*, 1999).

A ligação intra- e interespécies desses genes e a conservação da organização genômica são, por essa razão, consistentes com a cópia de um desses genes em um organismo ancestral e com a possibilidade da conservação filogenética do *femA* em todas as espécies estafilocócicas (VANNUFFEL *et al.*, 1999).

Vannuffel *et al.* (1999) analisaram a presença de genes homólogos do *femA* em *Staphylococcus hominis* e em *Staphylococcus saprophyticus* e compararam sua homologia com os genes *femA* das espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus simulans*. Com relação às comparações da seqüência e às análises filogenéticas eles observaram que a organização deste gene mostrou uma alternância entre regiões altamente conservadas e regiões variadas. Na análise dos ácidos nucléicos eles observaram uma homologia de 77,9% entre os genes *femA* dos *S. hominis* e *S. saprophyticus*. O gene *femA* dos *S. hominis* mostrou 78,3%, 77,1% e 75,2% de homologia com a seqüência correspondente nos *S. aureus*, *S. epidermidis* e nos *S. simulans*, respectivamente, considerando que *S. saprophyticus* compartilhou 75,1%, 76,2% e 76,2% de identidade com as mesmas seqüências. Resultados semelhantes foram observados com os genes *femB* de *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Estes dados mostram com precisão a diversidade genômica dos genes *femA* entre as espécies do gênero *Staphylococcus* e explica as razões para a deficiente amplificação do gene *femA* em estafilococos coagulase-negativa pelas técnicas citadas, já que os primers do *femA* específicos de *S. aureus* foram, de fato, complementares para as regiões específicas de *S. aureus*, enquanto foram não-homólogos com as regiões *femA* dos estafilococos coagulase negativo.

Assim como os genes *nuc* e 16S rRNA, o gene *femA* tem sido explorado como marcador específico de *S. aureus* em testes baseados em pesquisa de DNA, sendo esta uma útil ferramenta no diagnóstico diferencial de espécies estafilocócicas.

### 1.2.5 Patologia

O protótipo de uma lesão estafilocócica é o furúnculo ou outros abscessos localizados. *S. aureus* localizado em um folículo piloso provoca necrose tecidual (fator dermonecrótico). A coagulase é produzida, e coagula a fibrina em volta da lesão e dentro dos vasos linfáticos, resultando na formação de uma parede que delimita o processo e é

reforçada pelo acúmulo de células inflamatórias e, mais tarde, de tecido fibroso. No centro da lesão, ocorre liquefação do tecido necrótico (exarcebada por hipersensibilidade tardia), e o abscesso “aponta” na direção de menor resistência. A drenagem do líquido de centro necrótico é seguida de preenchimento lento da cavidade pelo tecido de granulação e cicatrização final (JAWETZ, MELNICK & ADELBERG, 1998).

A supuração focal (abscesso) é típica da infecção estafilocócica. A partir de qualquer foco, os microrganismos podem propagar-se através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para outras partes do corpo. A supuração em veias associadas à trombose constitui uma característica comum dessa disseminação. Na osteomielite, o foco primário de crescimento de *S. aureus* consiste tipicamente num vaso sanguíneo terminal da metafise de um osso longo, resultando em necrose do osso e supuração crônica. *S. aureus* pode causar pneumonia, meningite, empiema, endocardite ou sepse com supuração em qualquer órgão. Os estafilococos de baixa invasividade estão envolvidos em muitas infecções cutâneas (acne, piodermite ou impetigo). Os cocos anaeróbios (*Peptostreptococcus*) participam de infecções anaeróbias mistas (JAWETZ, MELNICK & ADELBERG, 1998).

#### 1.2.6 Manifestações Clínicas

A infecção estafilocócica localizada aparece na forma de abscessos ou de infecção de folículo piloso. Em geral, verifica-se uma reação inflamatória intensa, localizada e dolorosa que sofre supuração central e cicatriza rapidamente quando o pus é drenado. A parede de fibrina e células em torno do centro do abscesso tende a evitar a propagação dos microrganismos e não deve ser rompida por manipulação ou traumatismo (JAWETZ, MELNICK & ADELBERG, 1998).

A infecção por *S. aureus* também pode resultar da contaminação direta de uma lesão, como, por exemplo, infecção estafilocócica pós-operatória ou infecção após traumatismo (osteomielite crônica após fratura exposta, meningite após fratura de crânio). Se houver disseminação de *S. aureus* através de bacteremia, podem ocorrer endocardite, osteomielite hematogênica aguda, meningite ou infecção pulmonar. O quadro clínico assemelha-se aos observados em outras infecções hematogênicas. A localização secundária no interior de um órgão é acompanhada de sintomas de disfunção deste órgão e de supuração focal intensa (JAWETZ, MELNICK & ADELBERG, 1998).

### 1.2.7 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial das infecções estafilocócicas é feito pelo isolamento e identificação do microrganismo.

Entre as amostras utilizadas na pesquisa de estafilococos estão “swab” superficial, pus, sangue, aspirado traqueal ou líquido cefalorraquidiano para cultura, dependendo da localização do processo. A determinação de anticorpos no soro não tem qualquer valor. Nos esfregaços de sangue ou pus verifica-se a presença de estafilococos típicos, porém, não é possível diferenciar os microrganismos saprófitas (*S. epidermidis*) dos patogênicos (*S. aureus*) (JAWETZ, MELNICK & ADELBERG, 1998).

O isolamento é realizado nos meios de cultura comuns, como o ágar-sangue. Vários meios seletivo-indicadores, entre os quais se inclui o ágar manitol-salgado, podem também ser empregados para essa finalidade (MARTINS, 1999). As amostras semeadas em placas de ágar sangue produzem colônias típicas em 18 horas a 37°C, mas a hemólise e a produção de pigmento podem ocorrer após vários dias, principalmente à temperatura ambiente. As amostras contaminadas por uma microbiota mista podem ser cultivadas em meios contendo NaCl a 7,5%, visto que esta concentração de sal inibe a maioria dos microrganismos da microbiota normal, mas não *S.aureus* (JAWETZ, MELNICK & ADELBERG, 1998).

Na pesquisa de estafilococos em alimentos o meio utilizado é o Ágar Baird-Parker, onde as colônias típicas são circulares, lisas, úmidas, de coloração cinza escuro a negro, rodeadas ou não por halo transparente, duplo ou opaco. O diagnóstico da intoxicação alimentar é realizado pela pesquisa das enterotoxinas nos alimentos ingeridos e no vômito do paciente. De modo geral, *Staphylococcus aureus* é encontrado em grande quantidade ( $10^5$  ufc/g) no alimento que contém a enterotoxina responsável pelas manifestações clínicas (MARTINS, 1999).

Han *et al.* (2005) estudaram o comportamento (sobrevivência, crescimento, formação de enterotoxinas) de várias cepas de *S. aureus* numa simulação em escala laboratorial da produção de queijo tofu. Das 15 cepas testadas, sete apresentaram bom crescimento em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) estéril com alta concentração de NaCl (6-12% p/p), demonstrando sua halotolerância. Cepas halotolerantes produtoras de enterotoxinas foram inoculadas em vários estágios da produção do queijo tofu. Níveis de 6 a 12% de NaCl na salmoura foram baixos para inibir o crescimento microbiano e a produção de enterotoxinas. Igualmente, uma salmoura com 18% de NaCl não foi suficiente para inibir o crescimento microbiano, mas a produção de enterotoxinas foi evitada. A salmoura com

24% de NaCl foi eficiente em evitar o crescimento microbiano e a produção de enterotoxinas. A conclusão foi de que para garantir um mínimo de segurança na produção deste queijo contra a produção de enterotoxinas estafilocócicas deve ser utilizada uma concentração final de 9% de NaCl.

Outros testes devem ser utilizados no diagnóstico laboratorial como o teste da catalase e o teste da coagulase. Com relação às provas sorológicas e de tipagem, é possível detectar a presença de anticorpos contra o ácido teicóico em infecções profundas e prolongadas. Essas provas sorológicas têm pouco valor prático. A fagotipagem é utilizada para a avaliação epidemiológica da infecção apenas em epidemias graves por *S. aureus*, como as que podem ocorrer em hospitais.

### 1.2.8 Tratamento

A maioria dos indivíduos possui estafilococos na pele, no nariz ou na garganta. Mesmo que se possa remover os estafilococos da pele, ocorrerá quase imediatamente nova colonização por perdigoto. Como os microrganismos patogênicos geralmente se disseminam de uma lesão para outras áreas da pele através de dedos e pela roupa, é importante manter assepsia local meticulosa para controlar a furunculose (JAWETZ, MELNICK & ADELBERG, 1998).

Embora *S. aureus* possa ser suscetível à ação de várias drogas ativas contra bactérias Gram-positivas (tais como penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol), é também conhecido pela sua elevada capacidade de desenvolver resistência a diversas delas. Portanto, a antibioticoterapia adequada das infecções estafilocócicas deve ser precedida da escolha da droga com base nos resultados de testes de suscetibilidade (MARTINS, 1999).

A penicilina é a droga de escolha se a amostra for sensível. A introdução do uso da benzilpenicilina (penicilina G), na década de 40, resolveu, temporariamente, o problema do tratamento das estafilococcias. Pouco depois, no entanto, foi relatado o surgimento de amostras resistentes. A disseminação progressiva dessas amostras reduziu drasticamente o valor terapêutico desse antimicrobiano, sendo que, atualmente, apenas um percentual reduzido de amostras de *S. aureus* se apresenta sensível à penicilina. A resistência à penicilina é atribuída à produção de enzimas capazes de inibir a ação dessa droga, conhecida como penicilases, ou, mais genericamente, betalactamase, codificadas por genes plasmidiais (MARTINS, 1999).

O emprego de meticilina e outras penicilinas semi-sintéticas (tais como a oxacilina e cloxacilina) resistentes à ação de penicilases, iniciado em 1959, representou uma etapa significativa na terapia antiestafilocócica. Contudo, a resistência a essas drogas foi detectada cerca de dois anos após. As amostras resistentes à meticilina se espalharam rapidamente e sua frequência tem aumentado em diversas regiões geográficas, sendo responsáveis, particularmente, por surtos de infecções hospitalares. Um aspecto importante é o fato de a resistência à meticilina ter, em geral, características de heterogeneidade variada, o que levou a denominar as amostras que a expressam como heterorresistentes. Assim sendo, uma mesma amostra pode apresentar frequência variável de células individualmente sensíveis e resistentes a essa droga, o que dificulta a sua detecção em nível laboratorial (MARTINS, 1999).

Uma outra importante droga para a qual os estafilococos (particularmente os resistentes à meticilina) também têm se tornado resistentes é a gentamicina. A vancomicina é considerada a droga de escolha para o tratamento de estafilococcias de caráter grave, especialmente as causadas por amostras multirresistentes, incluindo à meticilina. Alguns estudos já citam amostras resistentes a vancomicina (MARTINS, 1999).

#### *1.2.9 Alimentos envolvidos em intoxicações estafilocócicas*

Os alimentos que geralmente estão envolvidos com intoxicações estafilocócicas incluem as carnes e produtos cárneos, aves e produtos com ovos, saladas com ovos, atum, batatas e massas, produtos de panificação, assim como tortas recheadas, bombas de chocolate, sanduíches recheados, leite e produtos laticínios (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001).

### 1.3 Leite

Segundo o Decreto Lei nº 15.642 de 09 de fevereiro de 1946, o leite é “o produto integral oriundo da ordenha completa e ininterrupta de vacas sadias e convenientemente alimentadas e tratadas, excetuando-se o período entre 30 dias antes e 10 dias após o parto”. A raça tem influência na produção e na composição do leite e, normalmente o teor de gordura aumenta do 1º para o 2º dia de lactação e deste para o 3º dia do processo permanecendo inalterado nos 4º e 5º dias do mesmo, diminuindo nos subsequentes (SOUZA, 2001).

A temperatura de congelamento do leite difere da água por causa de sua composição básica que é solução verdadeira (SOUZA, 2001). No seu estado natural, o leite é um líquido e sob esta forma é, normalmente, utilizado como alimento. Todavia, por se tratar de um alimento muito rico em nutrientes e em estado facilmente assimilável, a sua conservação sem intervenção tecnológica é praticamente impossível sendo, portanto, uma substância altamente perecível. Ao ser armazenado em condições ambientais, o leite sofre uma série de alterações devida, basicamente, à ação dos microrganismos contaminantes. Tais alterações e/ou transformações levaram ao desenvolvimento de vários derivados do leite, que passaram a ser utilizados como alimento: a coalhada, o iogurte e o queijo que surgiram empiricamente, muito antes que a tecnologia fosse conhecida (OLIVEIRA, 1986).

Com relação ao leite da espécie bovina, que é o mais utilizado, o componente que mais varia é a gordura, sendo geralmente fixado o teor mínimo de gordura no leite e conseqüentemente, no queijo resultante, de acordo com o tipo e variedade. A gordura tem um papel muito importante na cor, na consistência e no sabor final do queijo, já que promove uma melhor retenção da umidade, diminuindo, portanto, as perdas por desidratação durante a cura, armazenamento e comercialização. Além disso, há o aspecto econômico a se considerar que é o rendimento, o qual é cerca de 30% maior quando a gordura é transformada em queijo, em comparação com a manteiga (OLIVEIRA, 1986).

Na fabricação de queijos, a qualidade do produto é diretamente proporcional à qualidade do leite, que segundo alguns autores representa o elo fraco de uma cadeia de eventos que determinam a qualidade do queijo. Vários são os fatores que influenciam na qualidade do leite, como: pouco incentivo à produção de leite com qualidade, deficiência de transportes, o clima quente e, sobretudo, o despreparo cultural de grande parte dos produtores de leite (FURTADO, 1991).

Algumas propriedades do leite cru são fundamentais para o seu processamento, entre elas: a sua composição (gordura, proteína, lactose, sais minerais); mudanças após a sua produção (rancificação, oxidação, produção de ácidos, desenvolvimento de *off-flavor*, mudanças na micela de caseína); leite anormal (mastite); contaminações (bactérias termodúricas, bactérias psicotróficas, bacteriófagos); presença de resíduos (antibióticos, desinfetantes, metais). Quando se obtém o leite de um animal sadio, a manutenção da sua qualidade é uma questão de observância de uma série de regras, o que, na prática, dada a diversidade das condições de produção, armazenamento, coleta e transporte, torna-se difícil (FURTADO, 1991). Portanto, a observação destas condições e dos fatores que a afetam é crucial neste processo.

O leite para fabricação de queijos deve obedecer às mesmas exigências de qualidade e de conservação requeridas para o leite pasteurizado (OLIVEIRA, 1986). O queijo minas frescal é muitas vezes obtido a partir do leite cru, principalmente nos estabelecimentos artesanais e nas pequenas indústrias. A qualidade do leite cru e, por conseqüência, dos leites pasteurizados e esterilizados, assim como de derivados, está relacionada a fatores como deficiências no manejo e higiene de ordenha, índices elevados de mastite, manutenção e desinfecção inadequadas dos equipamentos, refrigeração ineficiente ou até inexistente, mão-de-obra desqualificada, entre outros (BRAMLEY & MAC-KINNON, 1990).

A pasteurização tem como finalidade destruir todos os patógenos que, por ventura, estejam presentes no leite. Na pasteurização do leite para a produção de queijos, o tratamento térmico exigido para a destruição dos patógenos, ou seja, 72°C por 15 segundos, ou 63°C por 30 minutos, destrói também os microrganismos lácticos importantes na produção do sabor e aroma dos queijos durante a cura, principalmente, gerando a exigência de se adicionar ao leite, após a pasteurização, culturas lácticas selecionadas especificamente para os diversos tipos de queijos (OLIVEIRA, 1986).

Na tentativa de evitar este problema muitos queijeiros optam pela prática de empregar temperatura entre 68°C e 70°C durante os mesmos 15 segundos. Esta é uma medida fraudulenta do ponto de vista de Saúde Pública, visto que tais temperaturas não são suficientes para destruir os microrganismos patogênicos resistentes (OLIVEIRA, 1986).

Sob o aspecto microbiológico, os microrganismos produtores de gás são de extrema importância por causa dos problemas de estufamento de queijos, sendo que os coliformes e os esporulados do gênero *Clostridium* são os mais importantes. Também é de extrema importância que o leite para queijos não apresente inibidores bacteriológicos como antibióticos, por exemplo, visto que a ação da cultura láctica é essencial na fabricação de praticamente todos os tipos de queijo (OLIVEIRA, 1986).

O leite deve ser filtrado, podendo ser clarificado dependendo de sua qualidade e do tipo de queijo que se deseja obter. A refrigeração do leite nas fazendas tem sido cada vez mais usada como um recurso para evitar a deterioração do leite (elevação da acidez) e para minimizar os custos de transporte, já que o leite é coletado a cada 2 ou 3 dias (FURTADO, 1991).

Existem vários tratamentos corretivos que permitem restabelecer praticamente todas as características normais do leite, mas, no caso do leite cru o mais recomendado é a pasteurização (72°C/15 segundos), após o qual diversos tratamentos podem ser aplicados no sentido de recuperar a aptidão original do leite para a coagulação e fabricação de

queijos como a adição de cloreto de cálcio, a pasteurização lenta do leite, a pré-maturação do leite com fermento e ainda a maturação prolongada do leite com fermento (FURTADO, 1991).

Um dos fatores que altera a qualidade do leite é a mastite. A mastite é uma infecção que pode ser causada por *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*. Doença comum em rebanhos bovinos pode se manifestar de três formas diferentes: mastite clínica (reconhecível ao olho nu e ao tato), mastite subclínica (não é evidente, mas provoca secreção de leite anormal) e mastite latente (detectada somente através de exames bacteriológicos). Uma série de alterações na composição físico-química do leite ocorre devido à mastite, dentre elas: mudança no teor de gordura do leite; variações nas frações protéicas – teores de caseína, alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina tendem a diminuir e teores de soroalbumina e imunoglobulinas tendem a aumentar; diminuição do teor de lactose; aumento no teor de cloretos (NaCl) e redução no teor de K e Ca; aumento dos teores de catalase, fosfatase alcalina e xantina oxidativa; aumento do pH e da viscosidade (FURTADO, 1991).

#### 1.4 Queijo Minas Frescal

O queijo minas pode ser considerado um tipo de queijo desenvolvido no Brasil e que teve sua origem nas fabricações caseiras difundidas no Estado de Minas Gerais, as quais existem até hoje. Foi na década de 1930, que o referido queijo teve a sua definição tecnológica e desde então tem crescido o volume de queijo minas fabricado em indústrias organizadas comercialmente (OLIVEIRA, 1986).

O Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal (BRASIL, 1997) estabeleceu a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deverá cumprir o queijo minas frescal destinado ao consumo humano. Segundo esta portaria, entende-se por queijo minas frescal, o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como um queijo semigordo, de alta umidade, a ser consumido fresco. Além disso, apresenta baixo pH (5,1-5,6) e em torno de 1,6% de NaCl (FREITAS *et al.*, 1993).

Tecnologicamente, o queijo minas não exige muita gordura na sua massa, embora o mesmo responda favoravelmente quando é mais elevado. Um leite integral, ou seja, com teores de gordura na faixa de 3 a 4%, apresenta-se como ideal para a fabricação de queijo minas. Entretanto, em termos tecnológicos, o leite deve apresentar-se dia-a-dia com uma

composição o mais constante possível, a fim de permitir a padronização da qualidade do produto. Para que tal resultado seja obtido, é recomendável a padronização do leite a um teor de gordura que possa ser mantido constante durante todo o ano, como por exemplo, 3,5%. Sob o ponto de vista higiênico-sanitário, o leite para queijo minas deve ser pasteurizado, visto que o Queijo Minas Frescal é normalmente consumido antes de dois meses após a fabricação (OLIVEIRA, 1986).

O queijo minas tem sido o objeto de estudo de vários pesquisadores em diferentes regiões do país. Os diferentes estudos buscam avaliar as características físico-químicas e as condições microbiológicas deste produto, avaliando também a metodologia para enumeração de microrganismos e dos melhores meios de cultura para isolamento destes microrganismos. O interesse por este produto se deve ao fato de que o queijo minas está relacionado a doenças de origem alimentar, como intoxicações estafilocócicas. Além do que, muitas são as espécies enteropatogênicas que têm sido encontradas no leite e em queijos armazenados sob temperaturas de refrigeração. A contaminação pós-pasteurização, produção, manipulação, equipamentos, temperaturas inadequadas durante o transporte e condições de estocagem podem resultar em altos níveis de microrganismos patogênicos e enterotoxinas no queijo (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Almeida Filho e Nader Filho (2000) investigaram a presença e o número de cepas de *S. aureus* em 80 amostras de queijo minas frescal produzido artesanalmente e comercializado na cidade de Poços de Caldas, MG. Os resultados obtidos evidenciaram a presença do microrganismo em 50% das amostras cujas contagens revelaram valores médios em torno de  $10^5$  UFC/g de queijo. Tais contagens apresentaram-se bem próximas das que são requeridas para a produção de enterotoxinas.

Peresi (2001) avaliou a qualidade microscópica e microbiológica de queijos minas frescal de 30 amostras de origem artesanal e 30 amostras de origem industrial. Foi realizada a contagem de coliformes fecais, a enumeração de estafilococos coagulase-positiva, pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. As cepas de *Salmonella* spp. e de estafilococos coagulase-positiva foram testadas quanto à resistência aos agentes antimicrobianos. Seus resultados revelaram sete amostras industriais e 23 amostras artesanais em desacordo com os padrões da legislação vigente, causados principalmente, pela presença de coliformes fecais e/ou estafilococos coagulase-positiva em níveis elevados. Não houve isolamento de *Listeria monocytogenes* em nenhuma das amostras, enquanto que, *Salmonella* spp. foram detectadas em duas amostras artesanais. Das cepas de estafilococos coagulase-positiva isoladas 50% foram resistentes a penicilina, 4,5% a tetraciclina e 4,5% a ambas. Os resultados microscópicos demonstraram que 20% das

amostras artesanais continham matérias estranhas externas e internas, sendo os fragmentos de insetos e pêlos de animais, as mais freqüentes; das amostras industriais, 8 % apresentaram matérias estranhas internas, sendo a totalidade delas contaminadas por fragmentos de insetos.

Loguercio e Aleixo (2001) avaliaram a qualidade microbiológica do queijo minas frescal produzido artesanalmente em Cuiabá, MT. Trinta amostras foram coletadas de dois pontos de comercialização e submetidas a contagem de *Staphylococcus aureus* em placas e a contagem estimativa de coliformes totais e fecais e *Escherichia coli* pela técnica do Número Mais Provável – NMP. Na determinação de coliformes fecais, 28 amostras (93,33%) apresentaram contagem acima de  $10^2$  NMP/g de queijo e na contagem de *Staphylococcus aureus*, em 29 amostras (96,67%) obteve-se valores superiores a  $10^3$  UFC/g de queijo.

Araújo *et al.* (2002) investigaram a presença de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Aeromonas* spp. e *Yersinia* spp. em 45 amostras de queijos minas frescal de três diferentes marcas comercializadas na cidade do Rio de Janeiro, RJ. *S. aureus* foi isolado em 20% das amostras, dos quais 17,7% estavam acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas caviae* foram detectadas em 17,7% das amostras. *Yersinia* spp. não foi detectada. EPEC foi isolada em 21,1% das amostras e os sorogrupos mais achados foram O127, seguido do O55 e O26.

Carmo *et al.* (2002) analisaram amostras de queijo minas frescal e leite cru suspeitos de serem a origem de dois surtos alimentares que acometeram 378 pessoas nas cidades de Passa-Quatro e Manhuaçu, MG. As análises dos queijos minas frescal mostraram que *S. aureus* estava presente nas amostras com contagens variando entre  $2,4 \times 10^3$  e  $2,0 \times 10^8$  UFC/g. Foi detectada a produção das enterotoxinas SEA, SEB e SEC. No leite cru foi evidenciada a presença de estafilococos coagulase-negativa com contagens acima de  $2,0 \times 10^8$  UFC/g e, foi detectada a produção das enterotoxinas SEC e SED.

Isepon, Santos e Silva (2003) analisaram a qualidade microbiológica de queijos minas frescal comercializados na cidade de Ilha Solteira – SP. Foram determinadas as contagens de microrganismos mesófilos, contagem de microrganismos proteolíticos e de coliformes. Segundo seus resultados 75% das amostras situaram-se fora dos padrões microbiológicos vigentes. Almeida & Franco (2003) analisaram 20 amostras de queijo minas frescal através das análises de *Salmonella* sp., coliformes fecais e *Staphylococcus aureus*. Seus resultados demonstraram que das 20 amostras analisadas, 18 foram positivas para coliformes fecais, duas foram estafilococos coagulase-positivas e em nenhuma se isolou *Salmonella* sp.

A contagem de *Staphylococcus aureus* é usada como um indicador de contaminação pós-processamento em indústrias de laticínios, possibilitando o controle sanitário destes produtos. Estudos têm mostrado que o queijo minas frescal e outros laticínios estão envolvidos em vários surtos de intoxicação alimentar estafilocócica no Brasil e em outros países. A Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), que estabelece o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, preconiza que para queijos de muito alta umidade, em torno de 55%, incluindo os queijos coalho com umidade correspondente, minas frescal e outros, devem ser pesquisados os seguintes microrganismos: coliformes a 45°C ( $5 \times 10^2$  UFC/g), estafilococos coagulase-positiva ( $5 \times 10^2$  UFC/g), *Salmonella* sp (ausência em 25g) e *Listeria monocytogenes* (ausência em 25g).

### 1.5 Detecção de patógenos alimentares

A análise microbiológica de um produto alimentício pode ser conduzida para investigar a presença ou a ausência de microrganismos nesse produto ou para quantificar os microrganismos presentes e para identificar e caracterizar as diferentes espécies microbianas. Inúmeros métodos laboratoriais de análise podem ser utilizados e, atualmente, esses métodos são comumente divididos em métodos “convencionais” e métodos “rápidos” (FRANCO, 2004a).

Os métodos convencionais recebem essa denominação porque foram desenvolvidos há muitos anos e desde então vêm sendo empregados como métodos oficiais na maioria dos laboratórios brasileiros e também em outros países. Esses métodos estão descritos em publicações consideradas de referência, internacionalmente aceitas. Entre essas publicações destacam-se o *Bacteriological Analytical Manual* (BAM), publicado em conjunto pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) e pela *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC International), o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, editado pela *American Public Health Association* (APHA) e o *Microorganisms in Foods – their significance and methods of enumeration*, publicado pela *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF). Além destes, existem ainda os métodos recomendados por outras associações como a *International Organization for Standardization* (ISO), a *International Dairy Federation* (IDF) e outras (FRANCO, 2004a).

Os métodos convencionais de detecção de bactérias em alimentos envolvem etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo seguidos por testes de identificação

morfológica, bioquímica e imunológica. Apesar de serem bem estabelecidos e de requererem materiais de consumo mais baratos, tais procedimentos apresentam algumas desvantagens como o intenso trabalho e a espera pelos resultados finais por vários dias. Muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos na busca de métodos rápidos e confiáveis para a detecção de microrganismos em alimentos (LANTZ, HAHN-HÄGERDAL & RADSTRÖM, 1994).

Os métodos rápidos surgiram a partir da década de 70, como consequência da necessidade de se abreviar o tempo necessário para a obtenção de resultados analíticos, melhorar a produtividade laboratorial, simplificar o trabalho e reduzir custos. Além dessas vantagens, alguns desses métodos apresentam maior sensibilidade e especificidade que os métodos convencionais (FRANCO, 2004a). Entre os métodos rápidos está a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A PCR tem sido estabelecida em diagnósticos microbiológicos como uma valiosa alternativa para os métodos convencionais. Rapidez, bom limite de detecção, seletividade e potencial para otimização são as maiores vantagens deste método. Entretanto, existem algumas variáveis a serem consideradas no uso da PCR, como o custo do alto investimento tecnológico, a necessidade de aprovação oficial, regulamentos e instruções padronizadas (MALORNY *et al.*, 2003).

Wang, Cao e Cerniglia (1997) desenvolveram um protocolo universal de PCR para a detecção de 13 espécies de patógenos alimentares. O protocolo utilizou um meio de cultura universal e as mesmas condições de PCR com os 13 sets de primers específicos. As espécies de patógenos alimentares examinadas neste trabalho foram: *Escherichia coli*, *E. coli*-ETEC, *E. coli*-O157-H7, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

Kuchta *et al.* (2002) apresentaram um método baseado na PCR que fornece resultados definitivos no terceiro dia após a coleta da amostra. Este método é equivalente a ISO 6579 em termos de limite de detecção da amostra e com 100% de exatidão. Kuchta *et al.* (2003) apresentaram um método também baseado na PCR para a detecção de *Listeria monocytogenes* que fornece resultados definitivos no terceiro dia após a coleta das amostras. Este método é equivalente a EN ISO 11290 ou a ISO 10560 em termos de limite de detecção da amostra e com 100% de exatidão.

### 1.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR, concebida em 1983 por Kary Mullis, é um método de amplificação de seqüências específicas de DNA ou RNA. Repetidas séries do ciclo envolvem a desnaturação do DNA molde, o anelamento dos *primers* e a extensão dos *primers* anelados pela DNA polimerase resultando em uma acumulação exponencial de fragmentos específicos. Devido à extensão do *primer*, os produtos sintetizados em um ciclo podem servir de molde para os próximos e o número de cópias do fragmento alvo dobra a cada ciclo (ERLICH, 1992).

Entre as aplicações deste método estão a clonagem de genes ou fragmentos de DNA/RNA; o diagnóstico genético; testes de mutações; teste de paternidade; mutagênese para investigação da função protéica; para avaliar diferenças quantitativas na expressão genética; transcrição reversa; identificação de mudanças na expressão de genes desconhecidos, *Diferencial Display* (DD)-PCR; análises forenses; controle de qualidade industrial (ERLICH, 1992).

Os componentes essenciais para a PCR são a DNA polimerase termoestável, os *primers* oligonucleotídeos, desoxinucleotídeos (dNTPs), DNA molde, íons magnésio, tampão e água. Geralmente o volume total de reação varia de 25 a 100  $\mu$ l.

*DNA alvo (molde)*: para a PCR deve haver ao menos uma cópia intacta do DNA alvo. Um grande número de cópias aumenta a probabilidade de sucesso na amplificação do DNA. O gene alvo pode ser de <0,1 a poucas kilobases. A quantidade de DNA tipicamente usada para PCR varia de 0,05 a 1,0  $\mu$ g. Uma amostra não necessita ser altamente purificada e pode ser preparada pela lise das células ou pela fervura. Todavia, algumas impurezas – como formalina, heparina, agentes quelantes de  $Mg^{2+}$ , detergentes e metais pesados (especialmente  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ ) podem ser eliminados ou diluídos a ponto de não inibir a amplificação do DNA (ATLAS & BEJ, 1994).

*Primers Oligonucleotídeos*: *Primers* oligonucleotídeos ou iniciadores são pequenas bandas únicas (segmentos de DNA), complementares a extremidade 5' das bandas do DNA alvo a ser amplificado. Para que o anelamento do *primer* ocorra especificamente na região do DNA a ser amplificada, deve haver uma completa identidade entre o DNA alvo e a seqüência nucleotídica do *primer*. Tipicamente os *primers* são compostos de 15 a 30 nucleotídios preferivelmente sem sobreposição nas extremidades 3'. Existem vários programas de computador que auxiliam na seleção e desenho de *primers* para amplificação de seqüências específicas. Estes programas ajudam a evitar erros na amplificação de locais que não são alvo no DNA, além de selecionar *primers* com conteúdo similar das bases

G+C permitindo então que uma eficiente temperatura de anelamento seja utilizada (ATLAS & BEJ, 1994).

Todos os *primers* para a amplificação do DNA alvo devem ter aproximadamente a mesma temperatura de fusão – *melting temperature* ( $T_m$ ), ou, mais especificamente, a mesma temperatura de anelamento ( $T_a$ ) para o DNA molde, e uma média de G+C de 40-60%. A  $T_a$  dos *primers* pode ser calculada tanto pela temperatura de fusão ( $T_m$ ) através da equação  $T_a = T_m - 5^\circ\text{C} = 2(\text{A}+\text{T}) + 4(\text{G}+\text{C}) - 5^\circ\text{C}$ , como pelo uso de microcomputadores.

Concentrações de *primers* entre 0,1 a 0,5 $\mu\text{M}$  são recomendadas. Altas concentrações podem promover a formação de produtos não-específicos e baixas concentrações podem permitir o anelamento da banda complementar competindo com o anelamento do *primer*, reduzindo o rendimento (ATLAS & BEJ, 1994).

*DNA Polimerase*: a concentração recomendada da *Taq* polimerase para PCR varia entre 1 a 5 U por 100  $\mu\text{l}$ . Se a concentração da enzima for muito alta, produtos não-específicos podem se formar. Se a concentração da enzima for muito baixa, será obtida uma quantidade insuficiente do produto desejado. A *Taq* polimerase tem uma atividade ótima em torno dos 70 $^\circ\text{C}$  e não é inativada por curtos períodos a temperaturas que desnaturam os fragmentos formados pela PCR (usualmente 90 a 95 $^\circ\text{C}$ ). A *Taq* polimerase tem uma meia-vida de 45 minutos a 95 $^\circ\text{C}$  (ATLAS & BEJ, 1994).

*Desoxirribonucleotídeos* livres são requeridos para a síntese de DNA. As concentrações de dNTPs para PCR devem ficar entre 20 a 200  $\mu\text{M}$  para cada desorribonucleotídeo para dar uma ótima especificidade. Os quatro dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) devem ser usados em concentrações equivalentes para minimizar erros na incorporação dos dNTPs (ATLAS & BEJ, 1994).

*Íons Magnésio* ( $\text{MgCl}_2$ ): A concentração dos íons magnésio afeta o anelamento dos *primers*, a temperatura de fusão do DNA ( $T_m$ ) e a atividade da enzima. PCRs devem conter entre 0,5 a 2,5 mM de magnésio sobre o total da concentração de dNTP. Várias concentrações de  $\text{MgCl}_2$ , usualmente variando entre 1,5 a 4 mM podem ser empregadas para aumentar a especificidade e melhorar o rendimento dos produtos da PCR (ATLAS & BEJ, 1994).

*Reação tampão*: Em adição aos reagentes diretamente envolvidos na reação, a PCR requer um tampão apropriado. A reação tampão recomendada é a de 10 a 50mM de Tris HCl (pH 8,3 a 8,9) (ATLAS & BEJ, 1994).

A PCR envolve ciclos repetidos de altas temperaturas para separar os filamentos de DNA, temperaturas relativamente baixas para permitir a hibridização dos *primers* (anelamento) com as regiões complementares do DNA alvo, e uma temperatura

intermediária para a extensão do *primer*. A variação da temperatura é realizada através do termociclador. É essencial que o termociclador promova aquecimento e resfriamento uniformes, fornecendo resultados uniformes em todas as reações (ATLAS & BEJ, 1994).

A temperatura apropriada para o anelamento dos *primers* depende da composição de bases, tamanho e concentração dos *primers* de amplificação. A temperatura de anelamento ideal é aquela que está cerca de 5°C abaixo da verdadeira temperatura de fusão ( $T_m$ ) dos *primers*. Temperaturas de anelamento que variam entre 55 a 72°C geralmente rendem os melhores resultados (ATLAS & BEJ, 1994).

Métodos baseados na PCR podem ser utilizados para caracterizar cepas que são isoladas e purificadas por métodos tradicionais de cultura. Eles substituem as etapas finais dos métodos convencionais, isto é, confirmação bioquímica e sorológica. A PCR também pode ser utilizada para a detecção de bactérias em alimentos pela sua aplicação direta nos produtos alimentícios, nos meios de pré-enriquecimento ou nos meios seletivos contendo culturas mistas. Ela pode ser aplicada após uma curta etapa de preparação da amostra envolvendo concentração e lise das bactérias (RIJPENS & HERMAN, 2002).

A PCR detecta tanto células viáveis quanto células não-viáveis. A etapa de enriquecimento antes da PCR garante que a detecção é baseada somente nas células viáveis até porque as células não-viáveis juntamente com os inibidores da PCR estão diluídos no meio de enriquecimento. A sensibilidade da técnica de PCR é aumentada quando uma etapa de enriquecimento é utilizada antes da PCR (LANTZ, HAHN-HÄGERDAL & RADSTRÖM, 1994).

Segundo Rijpens e Herman (2002) uma quantidade mínima de  $10^4$  bactérias/mL no meio de enriquecimento é necessária para detecção em uma PCR com 30 ciclos. O período de enriquecimento necessário para alcançar este número é extremamente dependente do microrganismo e do alimento. As bactérias presentes nos alimentos encontram-se na maioria das vezes, no estado de injúria e por isto requerem um período de recuperação antes de alcançar seu total potencial de crescimento.

Quando a PCR é aplicada em meios de pré-enriquecimento, uma possível inibição pelo meio ou por componentes dos alimentos deve ser considerada. Em geral, uma curta preparação das amostras, baseada em etapas de centrifugação, filtração e lavagem são suficientes para evitar tal inibição (RIJPENS & HERMAN, 2002).

A interferência da PCR ocorre na maioria das vezes pela presença de inibidores nos alimentos que podem afetar a ligação dos *primers* ou a eficiência da amplificação ou ainda causar resultados falso-negativos. Na aplicação da PCR para detecção de patógenos alimentares, alimentos com alto teor de proteína e gordura, como frango, carne, queijos,

entre outros, tendem a interferir na amplificação. Isto pode ser devido a presença de proteinases nestas amostras, que podem degradar a enzima. Além dos componentes dos alimentos, altos níveis de alguns ingredientes utilizados no enriquecimento ou meio e componentes utilizados na extração de DNA de amostras de alimentos também podem interferir na PCR. Por esta razão, por causa da complexidade dos alimentos, o método desenvolvido para um tipo de alimento em particular pode não ser utilizável para outros alimentos (FENG, 2001). Powell *et al.* (apud RIJPENS & HERMAN, 2002) encontraram uma proteinase presente no leite que inibia a PCR pela degradação da *Taq* polimerase. Bickley *et al.* (apud RIJPENS & HERMAN, 2002) relataram que os íons de cálcio presentes no leite eram a maior fonte de inibição da PCR e que o seu efeito inibitório pode ser parcialmente removido pelo aumento da concentração de magnésio na reação.

Um exemplo desta questão é que a extração usando detergentes e condições alcalinas pode reduzir os efeitos inibidores da PCR de alimentos constituídos por altas concentrações de proteínas e gorduras, mas, outros alimentos podem requerer etapas de diluição, lavagens, filtração e/ou centrifugação para remover os inibidores (FENG, 2001).

McLauchlin *et al.* (2000) desenvolveram uma reação simplex de PCR para a detecção dos genes das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH e SEI juntamente com o gene da toxina TSST-1 produzidas por *S. aureus*. Cento e vinte e nove culturas de *S. aureus* foram selecionadas, 39 das quais foram retomadas de 38 incidentes de intoxicação alimentar estafilocócica. Também foram analisados alimentos contaminados artificialmente e alimentos contaminados naturalmente com *S. aureus*. A contaminação artificial de alimentos foi realizada para verificar: (i) a sensibilidade do método através da inoculação de diferentes níveis de *S. aureus* nos alimentos e, (ii) para simular a temperatura em que os *S. aureus* crescem nos alimentos contaminados. Os alimentos reconhecidos como potencial veículo de intoxicação alimentar estafilocócica (sopa de cogumelos enlatada, creme de leite, queijo cotage, queijo mussarela, queijo gordo e presunto fatiado) foram comprados em supermercados e contaminados com culturas bacterianas de *S. aureus* previamente caracterizadas como enterotoxigênicas pela distribuição uniforme de 100 µL de suspensão bacteriana em 0,5 mL de alimento líquido ou 0,5 g de alimento sólido ou semi-sólido. As amostras de alimentos foram inoculadas com  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ , ou  $10^4$  UFC de *S. aureus* (que mostraram conter o gene que codifica a enterotoxina SEA) e foram homogeneizadas com 5 mL de água.

Os resultados da PCR para detecção dos genes de enterotoxinas nas 129 cepas foram: SEA (12), SEA +SEB (2), SEA+SEC + TSST-1 (2), SEA + SED (4), SEA +SEG+SEH (1), SEA + SEH (4), SEA + TSST-1 + SEG (10), SEA + TSST-1+ SEG + SEI (2), SEB

(5), SEB + SEC + SEG + SEI (2), SEB +SEG (2), SEB + SEG + SEI (5), SEB +SEH (1), SEC (7), SEC + SED + SEG + SEI (2), SEC + SEG (2), SEC +SEG + SEI (1) SEC + SEH (1), SEC + TSST-1 (16), SEC +TSST-1 +SEE (10), SEC + TSST-1 + SEG (1), SEE (1), SEE + TSST-1 (2), SEG (14), SEH (13), SEI (1) entre outros. Das cepas suspeitas de envolvimento em intoxicação alimentar, 9, 4 e 2 foram devidos a SEA, SEB e SEC (sozinhas ou associadas com outra enterotoxina), respectivamente. Os resultados da PCR nos alimentos contaminados com SEA em diferentes níveis de *S. aureus* mostraram uma nítida inibição das reações mas, isto foi parcialmente superado pela diluição. O exame da amostra controle (a diluição de células viáveis em água) indicou que o limite de sensibilidade para a detecção do gene da SEA foi  $\leq 4$  *S. aureus* por teste. Um nível similar de sensibilidade, de 4 a 40 UFC de *S. aureus*, foi alcançado na sopa e no presunto contaminados artificialmente. Porém, a detecção de genes das enterotoxinas foi fraca ou não foi obtida nos quatro produtos laticínios (queijos e creme de leite). Com relação ao teste da temperatura, no qual avaliou-se o crescimento após 30 minutos e 24 horas de incubação a 37°C, o crescimento do microrganismo inoculado foi detectado na sopa, no creme de leite e no presunto; algum crescimento foi detectado no queijo mussarela e no queijo gordo; células não-viáveis de *S. aureus* foram obtidas do queijo cotage. Uma variedade de diferentes cepas de *S. aureus* foi utilizada na inoculação da sopa e a amplificação dos genes de enterotoxinas de todas elas foi alcançada. Na sopa, no creme de leite e no presunto, os genes de enterotoxinas apropriados foram detectados, sendo que o creme de leite apresentou a detecção mais fraca. SEA e SED foram detectadas no queijo gordo e SEA no queijo mussarela, embora a amplificação tenha sido moderada. Não houve detecção da SED nos queijos cotage e mussarela artificialmente contaminados ou da SEA no queijo cotage.

Ercolini *et al.* (2004) estabeleceram uma PCR para detectar *S. aureus* em leite cru e em queijos fabricados a partir do leite cru. As amostras de leite foram contaminadas artificialmente, por diluições decimais, com a cepa *S. aureus* FRI 137, que contém os genes *nuc*, *sec*, *seg*, *seh* e *sei*, e foram utilizadas na produção dos queijos. O número de células viáveis foi determinado através do plaqueamento das diluições em Ágar Padrão Contagem (PCA). O Ágar Baird-Parker foi utilizado para a contagem de estafilococos viáveis em leite e queijos, não contaminados artificialmente, usados como controle. O microrganismo foi detectado em uma contaminação inicial de  $10^4$  UFC/mL pela amplificação dos genes *nuc* e *seh*. Um nível de  $10^5$  e  $10^7$  UFC/mL foi necessário para detectar *seg*, ou *sei* e *sec*. A extração de DNA e a amplificação da PCR foram realizadas a partir da cultura de leite que teve enriquecimento. Neste caso o limite de detecção

aumentou para  $10^2$  UFC/mL após 24 horas de enriquecimento quando o alvo eram os genes *nuc*, *seg* e *seh*. Após 48 horas de enriquecimento todas as amplificações da PCR renderam resultados positivos.

### 1.5.2 Multiplex PCR

A multiplex PCR consiste na amplificação simultânea de vários genes pelo uso de múltiplos pares de *primers* na mesma reação (ATLAS & BEJ, 1994; HENEGARIU *et al.*, 1997). O papel dos reagentes da PCR tem sido discutido e os protocolos de multiplex PCR têm sido descritos por vários grupos. Todavia, poucos estudos têm apresentado uma extensiva discussão sobre alguns fatores (ex., concentração dos *primers*, perfil do ciclo de amplificação, etc.) que podem influenciar os resultados da multiplex PCR.

Henegariu *et al.* (1997) desenvolveram um estudo em que mais de 50 locus foram amplificados sob várias combinações de multiplex PCR utilizando um mesmo tampão de reação contendo KCl. Segundo seus resultados são especialmente importantes para o sucesso da multiplex PCR a concentração dos *primers* dos vários *loci*, a concentração do tampão de reação, as temperaturas do ciclo de amplificação e o balanço entre o cloreto de magnésio e a concentração de desoxirribonucleotídeos (dNTPs). Também foram avaliados o tempo e a temperatura de extensão, o tempo e a temperatura de anelamento e a quantidade de *Taq* polimerase e de DNA molde.

Kapley *et al.* (2000) descreveram o papel dos ciclos de temperatura na garantia de uma detecção eficiente. Eles avaliaram o efeito do programa do termociclador, da concentração dos *primers* e a sensibilidade da multiplex PCR.

Becher, Roth e Peters (1998) desenvolveram um teste de multiplex PCR para detecção de múltiplos genes de toxinas estafilocócicas que usam sets de *primers* individuais para cada gene de toxina. Monday e Bonach (1999) desenvolveram um teste de multiplex PCR para todos os genes de toxinas já caracterizadas (*sea-sej*) e *tst* que também requer um único set de primers para detecção de genes individuais. Dodd, Sharma e Rees (2000) desenvolveram um teste de multiplex PCR de reação única para genes de enterotoxinas de *S. aureus* que utiliza um *primer* universal de genes de toxina em combinação com *primers* toxina-específicos para amplificar produtos característicos de genes de toxinas estafilocócicas.

Mehrotra, Wang e Johnson (2000) desenvolveram um teste de multiplex PCR para detecção de genes das enterotoxinas estafilocócicas A a E (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*), da toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (*tst*), das toxinas esfoliativas A e B (*eta* e *etb*), e

do gene de resistência intrínseca à meticilina (*mecA*). Dos 176 isolados testados, 107 foram coletados de “swabs” nasais de humanos saudáveis, 47 eram oriundos da Holanda e 19 eram cepas MRSA obtidos em um estudo nacional no Canadá. Dos 107 isolados, 21 (19,6%) foram positivos para SEA, 26 (24,3%) para TSST-1, 6 (5,6%) para SEB, 8 (7,5%) para SEC e 2 (1,9%) para SED. Nenhum dos isolados foi positivo para SEE, ETA, ETB ou para o gene *mecA*. Dos 47 isolados oriundos da Holanda, 6 foram positivos para SEA, 1 para SEB, 3 para SEC, 4 para ETA, e 11 para TSST-1. Entre as 19 cepas MRSA, 18 foram *mecA* positivo, 3 foram positivas para SEA, 2 para SEB, 3 para SEC, 2 para SED, 3 para SEE e 1 continha o gene para TSST-1. Todos os isolados testados foram positivos para o gene *femA*. Este teste demonstrou grande especificidade, rapidez, confiabilidade e uma alternativa econômica para os testes convencionais de PCR usados em laboratórios clínicos para identificar vários genes de toxinas estafilocócicas.

Tamarapu *et al.* (2001) desenvolveram uma multiplex PCR para detecção e diferenciação de *S. aureus* enterotoxigênicos em leite desnatado e queijo tipo cheddar. As amostras foram contaminadas artificialmente com as cepas de *S. aureus* ATCC 12600 e *S. aureus* 33862 e diluídas de 1 até  $10^{-8}$  UFC/mL. Os *primers* para o gene *sec* (enterotoxina C) e para o gene *nuc* (termonuclease) foram utilizados para as reações simplex e multiplex PCR. Para a simplex PCR, os produtos dos genes *nuc* e *sec* apresentaram os tamanhos esperados e foram observados satisfatoriamente em  $10^{-1}$  UFC/mL de *S. aureus* no leite desnatado e em  $10^{-1}$  UFC/20g de queijo tipo cheddar. Para a multiplex PCR, os produtos da reação foram observados nas diluições de  $10^{-8}$  a  $10^{-2}$  UFC/mL para o leite desnatado e na diluição  $10^{-2}$  UFC/20g para o queijo. Em ambos os produtos, a sensibilidade da amplificação foi diminuída em 1 log na multiplex PCR quando comparada com a simplex PCR. Chamberlain *et al.* (1994) sugeriram que uma competição entre os *primers* na multiplex PCR pode diminuir a sua sensibilidade.

Nájera-Sánchez *et al.* (2003) desenvolveram dois protocolos de multiplex PCR para detecção de *S. aureus* enterotoxigênicos: uma reação foi desenvolvida para detectar simultaneamente os genes das enterotoxinas SEA, SEB e SEE. A outra reação foi desenhada para detectar os genes das enterotoxinas SEC e SED. Ambas as reações foram padronizadas com o uso das cepas enterotoxigênicas de referência: FRI 722 (SEA), FRI 1007 (SEB), FRI 137 (SEC1), FRI 472 (SED) e FRI 326 (SEE). Os protocolos padronizados foram utilizados para determinar a presença dos genes destas enterotoxinas em 51 *S. aureus* isolados de carne (lingüiça, presunto e chouriço) e produtos lácteos (leite em pó e queijo) pela técnica de Baird-Parker. Os resultados mostraram que 50 das 51 cepas isoladas eram toxigênicas e produziram de uma a quatro enterotoxinas, sendo os

tipos mais frequentes a SEA e a SED. Bergdoll (1990), Rodrigues *et al.* (1993), Un Lee *et al.* (1998) e Vernozy-Rozand *et al.* (1996) demonstraram em seus trabalhos que a determinação do tipo de enterotoxina sugere a possível fonte de contaminação do alimento. Assim sendo, SEA e SEB têm sido associadas com contaminação humana (principalmente manipuladores de alimentos) e SEC e SED têm sido associadas com contaminação animal (principalmente em vacas e porcos).

Silva, Carmo e Silva (2005) analisaram 36 cepas de *S. aureus* isoladas de cabras com mastite e 64 cepas de *S. aureus* isoladas de vacas com mastite para determinar a distribuição dos genes que codificam as enterotoxinas SEA, SEB e SEC através da multiplex PCR. Das cepas isoladas de vacas com mastite, 4 (6,3%) amplificaram os genes da SEA e da SEB e 2 (3,1%) foram positivas para SEC. Das cepas isoladas de cabras com mastite, 31 (86%) foram positivas para a multiplex PCR e o gene da SEC foi detectado em todas elas.

#### 1.6 Critérios Microbiológicos para Alimentos e Segurança Alimentar

Entre os vários parâmetros que determinam a qualidade de um alimento, os mais importantes são aqueles que definem as suas características microbiológicas. Os critérios microbiológicos são utilizados para distinguir entre um produto aceitável ou inaceitável, ou entre processos e práticas de manipulação de alimentos aceitáveis ou não. Os números e os tipos de microrganismos presentes no produto alimentar podem ser utilizados para avaliar sua segurança e qualidade microbiológica. A segurança é determinada pela presença ou ausência de microrganismos patogênicos ou suas toxinas, pelo número de microrganismos patogênicos e pelo controle ou destruição destes agentes (PIERSON & SMOOT, 2001). Os testes sobre a qualidade microbiológica de um produto fornecem informações que permitem avaliá-lo quanto às condições de processamento, armazenamento e distribuição para o consumo, sua vida útil e quanto ao risco à saúde da população (FRANCO, 2004).

Para que a análise microbiológica forneça resultados que permitam um julgamento correto do produto analisado, é necessário que critérios de avaliação sejam claramente estabelecidos. Esses critérios são definidos de modo a permitir uma avaliação confiável e válida, relacionada à segurança que o produto oferece para o consumidor e também para o produtor (FRANCO, 2004).

Os critérios microbiológicos são usados para: (i) segurança alimentar, (ii) adesão às Boas Práticas de Fabricação (BPF), (iii) manutenção da qualidade (vida útil) de certos alimentos perecíveis, e (iv) conformidade de ingredientes alimentares. Além disso, estes

critérios fornecem às indústrias e às agências reguladoras guias para controle da cadeia alimentar e são componentes essenciais para qualquer ponto crítico de controle que remete a perigo microbiológico no Plano de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, o APPCC (PIERSON & SMOOT, 2001).

A vida útil dos produtos perecíveis é geralmente determinada pelo número de microrganismos inicialmente presentes. Como regra geral, os alimentos que contêm uma grande população de microrganismos deteriorantes terão uma vida útil menor do que aqueles alimentos que contêm um número menor dos mesmos microrganismos deteriorantes. Todavia, a relação entre a contagem total e a vida útil não é absoluta. Alguns tipos de microrganismos têm um maior impacto nas características organolépticas de um alimento do que outros devido à presença de diferentes enzimas que atuam sobre os constituintes do alimento. O efeito de certos níveis e/ou tipos de microrganismos deteriorantes, que mudam as características de qualidade, irão variar de acordo com o alimento, suas condições de armazenamento, assim como a temperatura e os gases atmosféricos. Todos estes parâmetros devem ser considerados no estabelecimento de limites para critérios microbiológicos utilizados para determinar a qualidade do produto e/ou sua vida útil (PIERSON & SMOOT, 2001).

Alimentos que são produzidos e estocados sob as Boas Práticas de Fabricação podem apresentar perfis microbiológicos diferentes do que daqueles expostos à condições inadequadas. O uso de materiais de baixa qualidade, a manipulação imprópria e a falta de condições sanitárias adequadas podem resultar em uma alta contagem bacteriana no produto final. Todavia, baixas contagens no produto final não significam adesão as BPF, já que alguns produtos apresentam altas contagens microbianas mesmo quando produzidos sob as melhores condições de processamento. Portanto, o uso de limites dos critérios microbiológicos para avaliar a adesão as BPF requer um grande conhecimento dos tipos e níveis de microrganismos presentes nas várias etapas do processamento para o estabelecimento da relação entre a Microbiologia dos Alimentos e as BPF (PIERSON & SMOOT, 2001).

No sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, um limite crítico é estabelecido para cada ponto crítico de controle de cada operação. Um limite crítico é o valor máximo e/ou mínimo para cada parâmetro biológico, químico ou físico que deve ser controlado através do ponto crítico de controle para prevenir, eliminar ou reduzir a um nível aceitável a ocorrência de um perigo à segurança alimentar. A aceitação internacional destes critérios pode levar a progressos no livre comércio através da padronização dos requerimentos para segurança e qualidade alimentar (PIERSON & SMOOT, 2001).

Ao se estabelecer os critérios a serem adotados para aprovar ou reprovar determinado produto alimentício, é necessário conhecer quais microrganismos devem ser pesquisados nesse produto. A pesquisa desses microrganismos é que vai determinar se o produto está ou não adequado, dos pontos de vista higiênico-sanitário e de saúde pública. De acordo com os diferentes graus de risco oferecidos por estes microrganismos (Tabela 1), a *The International Commission on Microbiological Specifications of Foods* – ICMSF - os classifica em cinco categorias diferentes (FRANCO, 2004):

1. microrganismos sem risco direto à saúde: neste grupo estão incluídos os microrganismos de importância limitada quanto à sua capacidade de causar alterações no alimento, sem serem patogênicos. É o caso dos fungos e das bactérias mesófilas aeróbias;
2. microrganismos que oferecem um risco indireto à saúde do consumidor: neste grupo incluem-se os microrganismos que dão indicações sobre as condições higiênico-sanitárias do produto (microrganismos indicadores). Sem serem patogênicos, eles podem indicar a possível presença de outros microrganismos prejudiciais à saúde, como *Salmonella*, *S. aureus* e muitos outros. Além disso, muitos deles podem causar alterações nas características originais dos alimentos;
3. microrganismos que oferecem risco direto à saúde do consumidor: aqui estão incluídos todos os microrganismos patogênicos de interesse em alimentos. Dependendo da gravidade da patologia que provocam e do tamanho dos surtos que são capazes de causar, são classificados em três grupos:
  - a. risco direto, moderado e disseminação limitada: microrganismos potencialmente patogênicos que causam doenças relativamente brandas. Normalmente, esses microrganismos são inicialmente transmitidos por um único alimento, mas contaminações cruzadas podem causar sua transferência para outros alimentos. Nesse grupo estão: *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* tipo A, *Coxiella burnetti*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* e o nematóide *Trichinella spiralis*;
  - b. risco direto, moderado e disseminação extensa: microrganismos potencialmente patogênicos, mas que causam doenças mais graves que as

do grupo anterior, e em doses infectantes mais baixas. São capazes de se difundir pelos alimentos com mais facilidade. Pertencem a esse grupo: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* patogênica, *Shigella* sp, *Vibrio parahaemolyticus* e estreptococos beta-hemolíticos;

- c. risco direto e grave: microrganismos altamente patogênicos, que não devem estar presentes em nenhum alimento. Pertencem a esse grupo: *Clostridium botulinum*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A e B, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella dysenteriae* tipo I, *Vibrio cholerae*, *Brucella melitensis*, *Clostridium perfringens* tipo C e vírus da hepatite infecciosa.

Segundo Pierson & Corlett (1992) os microrganismos patogênicos de origem alimentar podem ser agrupados em três categorias baseadas na severidade do perigo potencial (isto é, perigos severos, perigos moderados com potencial disseminação extensa, e perigo moderado com disseminação limitada) (Tabela 1).

A aprovação ou rejeição de qualquer produto alimentício submetido a análise está na dependência dos resultados da análise e dos critérios microbiológicos adotados.

Os critérios microbiológicos podem ser obrigatórios ou de orientação. Um critério obrigatório é aquele que não pode ser desobedecido em nenhuma situação. Os alimentos que não estiverem de acordo com esse critério devem ser reprovados. A reprovação significa, entre outras possíveis, uma das seguintes providências: destruição do produto, reprocessamento, devolução do produto ao fabricante, suspensão da licença para comercialização. Critérios de orientação servem para alertar sobre possíveis problemas no processamento, armazenamento, distribuição e comercialização dos alimentos, sem necessidades de providências drásticas como as que determinam um critério obrigatório (FRANCO, 2004).

Sendo assim, padrão microbiológico é um critério obrigatório, pois faz parte de uma lei ou de uma regulamentação administrativa. O não atendimento ao padrão microbiológico vigente constitui violação da lei, e medidas legais por parte dos órgãos competentes são possíveis. As normas microbiológicas, antes denominadas “limites recomendados”, são de orientação e correspondem a um critério utilizado pela indústria alimentícia para monitoramento dos pontos críticos de controle de todo o processo produtivo. As normas microbiológicas são estabelecidas pela própria indústria, podendo variar de uma parte para outra, e serem ainda mais ou menos rígidas que os padrões microbiológicos. Além das normas existem especificações microbiológicas que são utilizadas no comércio de

alimentos. O atendimento às especificações é uma condição para o acordo entre vendedores e compradores de alimentos (FRANCO, 2004).

Os padrões microbiológicos do Ministério da Saúde, vigentes neste momento estão contidos na Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Em 26 de novembro de 1993, o Ministério da Saúde aprovou a Portaria nº 1.428 que contém o “Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos”, as “Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos” e o “Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ’s) para Serviços e Produtos na Área de Alimentos”, e em 15 de setembro de 2004, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA aprovou o “Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação”. Os padrões do Ministério da Agricultura constam do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), composto pelos Decretos nº 30.691, de 29 de março de 1952, e nº 1.255, de 25 de junho de 1962, que têm hoje inúmeras portarias complementares. Em níveis estadual e municipal, alguns estados da federação e municípios têm legislação própria, citando como exemplo, os Códigos Sanitários (FRANCO, 2004).

A Organização Mundial de Comércio (OMC) fornece uma estrutura para resguardar as feiras comerciais e harmonizar os padrões e requerimentos para importação dos alimentos comercializados através dos Acordos de Aplicação Sanitária Medidas e Fitossanitárias e das Barreiras Técnicas de Comércio. Aos países é requerido que seus padrões sejam estabelecidos com base na ciência, que estabeleçam programas com metodologias de análise de riscos, e que desenvolvam meios para alcançar equivalência entre os métodos de inspeção, análises e certificação entre si (LUPIEN & KENNY, 1998; RANDELL & WHITEHEAD, 1997). A OMC recomenda o uso de padrões, diretrizes e recomendações desenvolvidas pelo *Codex Alimentarius* para facilitar a harmonização dos padrões. Melhorias no desenvolvimento e execução dos critérios microbiológicos continuarão a ser feitas com aceitação internacional e com larga implementação dos pontos do APPCC, um sistema de prevenção para controle alimentar baseado em dados científicos.

**Tabela 1:** Microrganismos patogênicos e parasitas agrupados com base na severidade do risco

---

I. Perigos severos

*Clostridium botulinum* tipos A, B, E e F

*Shigella dysenteriae*

*Salmonella typhi*: paratyphi

*Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

Vírus da Hepatite A e E

*Brucella abortus*: B suis

*Vibrio cholerae* O1

*Vibrio vulnificus*

*Taenia solium*

II. perigos moderados: potencial disseminação extensa <sup>a</sup>

*Listeria monocytogenes*

*Salmonella* spp.

*Shigella* spp.

Outras *Escherichia coli* enterovirulentas (EEC)

*Streptococcus pyogenes*

Rotavírus

Vírus Norwalk

*Entamoeba histolytica*

*Diphyllobothium latum*

*Ascaris lumbricoides*

*Cryptosporidium parvum*

III. perigo moderado: disseminação limitada

*Bacillus cereus*

*Campylobacter jejuni*

*Clostridium perfringens*

*Staphylococcus aureus*

*Vibrio cholerae*, não O1

*Vibrio parahaemolyticus*

*Yersinia enterocolitica*

*Giardia lamblia*

*Taenia saginata*

---

<sup>a</sup> Todos classificados como perigos moderados, suas complicações e seqüelas podem ser severos em certas populações susceptíveis. Fonte: The International Commission on Microbiological Specifications of Foods (1986)

### 1.6.1 Planos de Amostragem

Considerando que a distribuição dos microrganismos nos alimentos não é uniforme, quanto maior for o número de unidades um produto submetido a análise, maior será o significado estatístico do resultado obtido. É muito importante que a amostragem feita reduza ao mínimo as chances de reprovar um produto aceitável ou de aprovar um produto inadequado (FRANCO, 2004).

Planos de amostragem foram inicialmente propostos pelo ICMSF em 1974 e, posteriormente, revistos em 1978. De acordo com este órgão, os diferentes planos de amostragem são subdivididos em 15 categorias (Tabela 2), de acordo com o grau de risco que os microrganismos contaminantes podem oferecer ao produtor e ao consumidor. O risco é dependente do tipo de microrganismos presentes e de seu número. Alguns microrganismos apenas deterioram o produto (categorias 1, 2 e 3), outros são indicadores da possível presença de patógenos (categorias 4, 5 e 6), outros são patogênicos mas causam doenças leves e são de difusão restrita (categorias 7, 8 e 9), outros são patogênicos causando doenças leves e são de difusão extensa (categorias 10, 11 e 12), e outros são patogênicos e podem causar doenças graves (categorias 13, 14 e 15). O grau de risco é tão mais grave quanto maiores forem as chances de os microrganismos presentes se multiplicarem, ou seja, o grau de risco depende das condições de armazenamento do produto (FRANCO, 2004).

**Tabela 2:** Plano de severidade (caso) em relação ao grau de perigo à saúde e condições de uso.

<b>Condições esperadas do alimento ao ser manipulado e consumido após amostragem, no curso usual dos eventos</b>			
<b>Tipo de Perigo</b>	<b>Grau de perigo reduzido</b>	<b>Não causa alteração no perigo</b>	<b>Pode alterar o perigo</b>
<i>Sem perigo direto à saúde</i> (ex. contaminações gerais, tempo de vida útil reduzida e deterioração) <i>Perigo à saúde</i>	Caso 1	Caso 2	Case 3
Baixo, indireto (indicador).	Caso 4	Caso 5	Caso 6
Moderado, direto, disseminação limitada.	Caso 7	Caso 8	Caso 9
Moderado, direto, com disseminação potencialmente extensiva.	Caso 10	Caso 11	Caso 12
Severo, direto	Caso 13	Caso 14	Caso 15

Fonte: The International Commission on Microbiological Specifications of Foods (1986)

Na Tabela 3, **n** representa o número de unidades, retiradas de um único lote de produto, analisadas independentemente, e **c** representa o número máximo aceitável de unidades do lote que excedem o número máximo de microrganismos por grama tolerado (FRANCO, 2004).

Conforme a Tabela 3, os planos de amostragem das categorias 1 a 9 são de três classes, e os das categorias 10 a 15 são de duas classes. Nos planos de duas classes, a unidade analisada pode ser classificada como aceitável ou como inaceitável, ou seja, o resultado está ou não de acordo com o esperado. Em um plano de três classes, estabelecem-se números limites: um limite inferior designado por **m**, e um limite superior designado por **M**. Este plano, evidentemente, só se aplica nas análises quantitativas. Uma unidade é considerada aceitável se o resultado for inferior a **m** e inaceitável se for superior a **M**. Resultados entre **m** e **M** conferem ao produto uma qualidade chamada marginal ou intermediária (conforme a RDC nº 12 da ANVISA). Quando a categoria se refere a um plano de três classes, o valor de **c** representa o número total de unidades analisadas que podem apresentar resultados superiores ao limite mínimo **m** (FRANCO, 2004).

Um plano de duas classes é mais simples que o de três classes. Em um plano de duas classes em que  $n = 5$  e  $c = 0$  e o critério é ausência de *Salmonella* sp em 25 gramas de produto, se houver uma unidade positiva para *Salmonella* sp, entre as cinco analisadas, todo o lote é rejeitado. Se  $n = 5$  e  $c = 2$  e o critério é contagem máxima de coliformes 100/g, se houver até duas unidades com contagem de coliformes superior a esse limite, o lote é aprovado, mas se o número de unidades com resultados superiores a 100/g for três ou mais, o lote é rejeitado. Para ilustrar um exemplo de plano de três classes, considere-se um produto em que a contagem total não deve exceder  $10^6/g$  (**M**) ou ser maior que  $10^5/g$  (**m**) em três de cinco unidades analisadas. Nesse exemplo,  $n = 5$ ,  $c = 3$ ,  $m = 10^5$  e  $M = 10^6$ . Se uma única unidade der resultado maior que  $10^6/g$ , o lote deve ser rejeitado, o mesmo acontecendo quando quatro ou mais unidades derem resultado superior a  $10^5/g$  (FRANCO, 2004).

**Tabela 3:** Recomendação de planos de amostragem de acordo com os riscos à saúde e condições de manipulação.

<b>Condições esperadas do alimento na manipulação e consumo após a amostragem</b>			
Grau de relação para utilidade e perigo à saúde	Condições que reduzem o grau de relação	Condições que não causam mudança na relação	Condições que podem aumentar a relação
<i>Sem perigo direto à saúde</i>	Aumento da vida útil Caso 1	Sem alterações Caso 2	Vida útil reduzida Caso 3
Ex., vida útil reduzida e deterioração.	Plano de três classes n=5, c=3	Plano de três classes n=5, c=2	Plano de três classes n=5, c=1
<i>Perigo à saúde</i>			
Baixo, indireto (indicador).	Perigo reduzido Caso 4	Sem alterações Caso 5	Perigo aumentado Caso 6
	Plano de três classes n=5, c=3	Plano de três classes n=5, c=2	Plano de três classes n=5, c=1
Moderado, direto, disseminação limitada.	Caso 7	<b>Caso 8</b>	Caso 9
	Plano de três classes n=5, c=2	<b>Plano de três classes n=5, c=1</b>	Plano de três classes n=10, c=1
Moderado, direto, com disseminação potencialmente extensiva.	Caso 10	Caso 11	Caso 12
	Plano de duas classes n=5, c=0	Plano de duas classes n=10, c=0	Plano de duas classes n=20, c=0
Severo, direto	Caso 13	Caso 14	Caso 15
	Plano de duas classes n=15, c=0	Plano de duas classes n=30, c=0	Plano de duas classes n=60, c=0

Fonte: The International Commission on Microbiological Specifications of Foods (1986)

Considerando que as decisões de aprovar ou rejeitar um lote são baseadas nos resultados obtidos com unidades amostradas desse lote, deve-se levar em conta que esses resultados não indicam necessariamente a exata situação do lote. Existe sempre a probabilidade de se rejeitar lotes satisfatórios e de aprovar lotes insatisfatórios. A probabilidade de se rejeitar lotes satisfatórios define o chamado “risco do produtor”, e a probabilidade de aprovar lotes insatisfatórios constitui o “risco do consumidor”. É importante lembrar também que um mesmo lote pode ser rejeitado para uma determinada finalidade e ser aprovado para outra. Por exemplo, um lote de leite cru pode ser rejeitado para ser classificado como do tipo B e ser aprovado para ser classificado como do tipo C (FRANCO, 2004).

Os planos de amostragem para cada tipo de produto alimentício podem ser especificados por cada país, através de legislação própria. No caso de indústrias produtoras de alimentos, muitas definem seus próprios planos de amostragem, que são válidos para seus programas internos de controle de qualidade. No entanto, os planos de amostragem propostos pelo ICMSF são adotados internacionalmente.

A severidade dos planos de amostragem para alimentos é baseada tanto no perigo para os consumidores de microrganismos patogênicos, suas toxinas ou seus metabólitos, quanto na deterioração da qualidade do produto a um estado inaceitável, levando em conta os tipos de microrganismos presentes e sua contagem (ICMSF, 1986).

A intensidade do perigo de doença de origem alimentar é proporcional ao número de microrganismos presentes no alimento; se o número é alto, o perigo aumenta e se o número é reduzido, o perigo também se reduz. Em alguns casos, os alimentos são apenas veículos de infecções microbianas. O tratamento dado aos produtos alimentícios em toda a cadeia alimentar: distribuição, estocagem e preparação para consumo, pode diminuir, manter ou aumentar o número de microrganismos, enquanto toxinas lábeis podem ser decompostas e toxinas termoestáveis podem permanecer (ICMSF, 1986).

A escolha do plano de amostragem deve considerar: (1) o tipo e a gravidade dos perigos envolvidos pelo microrganismo para o teste que será realizado; e (2) as condições esperadas do alimento ao ser manipulado e consumido após a amostragem. A Tabela 2 classifica as 15 diferentes categorias de planos de amostragem que consideram estes fatores. Na tabela, a severidade no plano de amostragem aumenta com o tipo e o grau de perigo: de uma situação onde não há perigo à saúde, passando a um baixo risco indireto (como o que envolve a presença de microrganismos indicadores), para riscos diretos relacionados a doenças moderadas ou severas (ICMSF, 1986).

A severidade do plano de amostragem também muda de acordo com as condições esperadas para o alimento ao ser manipulado. Riscos podem permanecer inalterados, reduzidos pela cocção ou aumentados pelo subsequente crescimento de microrganismos. O plano mais brando é o caso 1. A severidade aumenta da esquerda para a direita e do topo para baixo na tabela, logo o caso 15 é o mais severo (ICMSF, 1986).

Na determinação da natureza do perigo causado pelas espécies microbianas causadoras de doenças de origem alimentar devemos considerar alguns fatores como: considerações epidemiológicas (ex., frequência com que causam a doença), características clínicas (e.x., severidade e duração da doença), e características ecológicas (interações entre ambiente e hospedeiro que influenciam na transmissão da doença). Estas, e a existência de métodos laboratoriais apropriados devem ser levados em consideração na seleção do plano de amostragem (ICMSF, 1986).

## 2 Objetivos

---

### Objetivos Gerais

- Detectar genes associados aos fatores de virulência através da Reação Multiplex PCR (M-PCR), fornecendo informações sobre a qualidade microbiológica dos queijos minas frescal para a prevenção de situações que possam causar danos à Saúde Coletiva.

### Objetivos Específicos

- Avaliar a presença de estafilococos coagulase-positiva nos queijos minas frescal comercializados em supermercados de algumas regiões do Rio de Janeiro.
- Padronizar um protocolo Multiplex PCR para detecção de genes que codificam enterotoxinas estafilocócicas em queijo minas frescal.
- Detectar os genes que codificam para as enterotoxinas estafilocócicas *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e do gene *femA* através da Multiplex PCR.

### 3 Justificativa

---

Segundo o Artigo 2º da Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990 (BRASIL, 1990), que dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, entre outros, “a saúde é um direito fundamental do ser humano, devendo o Estado prover as condições indispensáveis ao seu pleno exercício”. O Artigo 3º dispõe que a saúde tem como fatores determinantes e condicionantes, entre outros, a alimentação, a moradia, o saneamento básico, o meio ambiente, o trabalho, a renda, a educação, o transporte, o lazer e o acesso aos bens e serviços essenciais; os níveis de saúde da população expressam a organização social e econômica do País.

O Sistema Único de Saúde - SUS como disposto nesta mesma lei tem como um de seus objetivos a identificação e divulgação dos fatores condicionantes e determinantes da saúde. Incluído no campo de sua atuação está a execução de ações de vigilância sanitária, que é um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo; e, o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1990).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) estão à frente no desenvolvimento de apontamentos baseados em riscos para o gerenciamento de perigos à saúde pública em alimentos. A ferramenta utilizada é a análise de riscos que é composta por três componentes: avaliação de risco, gerenciamento do risco e comunicação do risco (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003b).

A busca por técnicas mais rápidas e eficazes de detecção de microrganismos que representem risco imediato de doenças de origem alimentar é fundamental para a produção de novos conhecimentos técnicos que viabilizem uma ação sanitária mais eficiente. Portanto, neste projeto foram efetuadas partes da avaliação de risco no que se refere à identificação e caracterização do perigo biológico e a caracterização do risco que alimentos contaminados por *S. aureus* contendo o gene para a produção de enterotoxinas. O uso da multiplex PCR fornece informações necessárias para controle de infecções e terapia apropriada durante surtos de doenças causadas por *S. aureus*. É importante reconhecer que esta técnica somente identifica cepas que possuem os genes que codificam para as

enterotoxinas, porém, a expressão e secreção destas toxinas são independentes e necessitam de métodos imunológicos para sua detecção.

Considerando o baixo custo e o tempo de análise reduzido para detectar os seis genes de *S. aureus* pela multiplex PCR, esta é uma poderosa ferramenta no estudo de genótipos de isolados estafilocócicos. Este procedimento foi especialmente desenvolvido para ser ajustado aos padrões de trabalho diário, nas rotinas de análises laboratoriais de detecção da presença de genes que codificam para enterotoxinas (MEHROTRA, WANG & JOHNSON, 2000).

## 4 Metodologia

---

As técnicas microbiológicas empregadas foram baseadas no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA, 1992), no *Bacteriological Analytical Manual* (FDA, 2003) e no POP 65.3210.032 do Manual de Qualidade do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS – FIOCRUZ.

O protocolo de PCR empregado foi baseado no trabalho de Mehrotra, Wang e Johnson (2000) que consiste na detecção de genes de enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C, D e E) e no gene *femA* pelo teste Multiplex PCR.

### 4.1 Plano de Amostragem

O plano de amostragem foi desenhado de acordo com as tabelas 3, 4 e 5. Neste trabalho o plano de amostragem utilizado foi o caso de número 8 em que o perigo à saúde é moderado, direto, com disseminação limitada e sem alteração do grau de perigo após a amostragem.

O número de amostras coletadas para análise foi 30, ou seja, respeitando o n de no mínimo, cinco amostras.

### 4.2 Pesquisa das Colônias Estafilococos Coagulase-Positiva

Trinta amostras de Queijo Minas Frescal, pesando no mínimo 200g cada, de três marcas comerciais (10 de cada) foram compradas em supermercados de regiões do Estado do Rio de Janeiro em três períodos diferentes. Destas, 10 amostras foram de queijos comercializados em embalagens tipo queijeira, 10 embaladas em potes plásticos hermeticamente fechados e 10 em embalagens plásticas de polietileno de baixa densidade. A temperatura do balcão térmico de distribuição nos supermercados foi conferida. Após a coleta, as amostras foram transportadas em banho de gelo e analisadas dentro de seu prazo de validade (Esquema 1).

Alíquotas de 25 gramas ( $\pm 0,1$  grama) de cada amostra foram pesadas assepticamente e transferidas para saco plástico do homogeneizador tipo “Stomacher”, posteriormente foram adicionados 50 mL de tampão fosfato de Butterfield. A mistura foi homogeneizada durante 60 segundos e o homogenato foi retornado ao frasco erlenmeyer contendo o restante do

tampão fosfato de Butterfield, resultando assim em uma diluição equivalente a  $10^{-1}$ . A partir desta, foi obtida a diluição  $10^{-2}$  transferindo-se 10 mL da diluição precedente para 90 mL do mesmo diluente.

Para a diluição  $10^{-1}$  foram distribuídos dois volumes de 0,2 mL, dois volumes de 0,3 mL (total 1 mL) e dois volumes de 0,1 mL na superfície de seis placas de Ágar Baird-Parker. Para a diluição  $10^{-2}$  foram distribuídos dois volumes de 0,1 mL na superfície de duas placas. O inóculo foi espalhado com o auxílio de alça de Drigalsky por toda a superfície do meio. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 48 horas, em posição invertida.

Para a contagem das colônias foram selecionadas placas, da mesma diluição, que apresentaram de 30 a 300 colônias circulares, lisas, úmidas, de coloração cinza escuro a negro, rodeadas ou não por halo transparente, duplo ou opaco. Durante a contagem os diferentes tipos de colônias foram classificados, enumerados e encaminhados para os ensaios de identificação separadamente.

As características morfotintoriais das colônias selecionadas foram verificadas através do método de coloração de Gram (RIBEIRO & SOARES, 2002). Os estafilococos se apresentam como cocos Gram positivos agrupados em forma de cachos. Para o Teste da Catalase foi transferida uma alçada do crescimento em ágar nutriente para a superfície de uma lâmina de vidro. Sobre o crescimento foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. O resultado foi considerado positivo quando foi observado despreendimento de oxigênio através da formação de bolhas. Os representantes do gênero *Staphylococcus* apresentam-se como catalase positivos.

Para o teste confirmatório para estafilococos coagulase-positiva foram selecionadas mais de uma colônia típica que tenha se apresentado como células em forma de cocos, Gram positivos, dispostos em cachos, com resultado positivo para o teste da catalase.

O teste da coagulase foi realizado transferindo-se 0,3 mL da cultura em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) para tubo de ensaio 13x100mm. À cultura foi adicionado 0,5 mL de plasma de coelho com EDTA e o tubo foi homogeneizado vigorosamente. A mistura foi incubada a  $35 \pm 2$  °C e observada periodicamente para verificar a formação de coágulos no intervalo de 6 horas.

A formação de coágulo foi observada em diferentes intensidades:

**1 +** : reação com formação de coágulo pequeno e fraco, que pode ser observado quando o tubo é inclinado. O coágulo é visivelmente diferenciado da parte líquida da mistura.

**2 +** : reação com formação de coágulo fraco. Na inclinação do tubo ainda se observa a diferenciação do coágulo com a parte líquida da mistura, porém este se apresenta de forma mais difusa.

**3 +** : reação com formação de coágulo de forte intensidade, que se desloca do fundo do tubo quando este é inclinado.

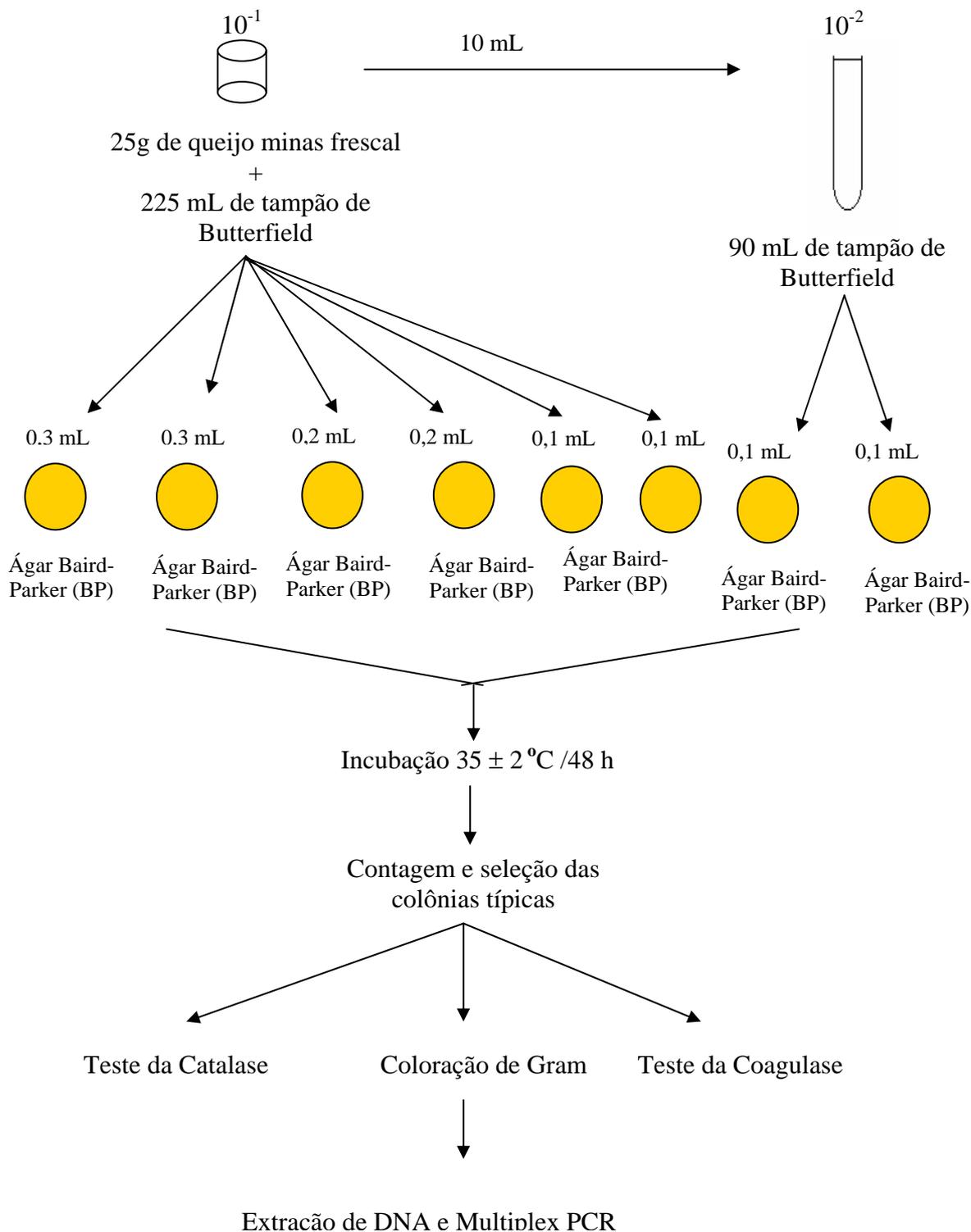
**4 +** : reação com formação de coágulo de forte intensidade, que não se desloca do fundo do tubo quando este é invertido.

A formação de coágulo, de qualquer intensidade (1+ a 4+) indicou resultado positivo.

No cálculo e expressão dos resultados foram somados os números dos diferentes tipos de colônias das placas da diluição selecionada, que apresentaram resultados característicos de estafilococos coagulase-positiva nos testes de triagem e coagulase. O número total de colônias das placas da mesma diluição, caracterizadas como coagulase-positiva, foi multiplicado pelo fator de diluição e pela quantidade de inóculo utilizado.

Cento e onze colônias foram selecionadas para a Reação Multiplex PCR para detecção dos genes que codificam as enterotoxinas A, B, C, D e E. Estas colônias foram isoladas das 30 amostras de queijo minas frescal e selecionadas aleatoriamente de forma que os diferentes lotes fossem analisados: amostra 2 (14 colônias), amostra 3 (15 colônias), amostra 5 (15 colônias), amostra 11 (13 colônias), amostra 21 (7 colônias), amostra 22 (6 colônias), amostra 25 (9 colônias), amostra 27 (15 colônias), amostra 28 (8 colônias) e amostra 30 (9 colônias).

**Esquema 1:** Pesquisa de Estafilococos Coagulase-Positiva em 30 amostras de queijo minas frescal.



### 4.3 Padronização da Multiplex PCR

#### 4.3.1 Cepas de Referência

As cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 (*sea*), ATCC 14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), ATCC 23235 (*sed*), ATCC 27664 (*see*), foram utilizadas na padronização da Multiplex PCR.

As cepas produtoras das enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec* e *sed* foram inoculadas em cinco mL de Caldo Nutriente e a cepa produtora da enterotoxina *see* foi inoculada em cinco mL de Caldo BHI e, foram incubadas por 16-24 horas a  $35 \pm 2$  °C com agitação de 150 rpm (L.E.D. Orbit Shaker, Lab-line Instruments, Inc., Melrose park, ILL, USA). Todas as cepas foram produtoras do gene *femA*. Posteriormente, foi realizada a semeadura pela técnica de esgotamento destas culturas em placas de Ágar Baird-Parker a fim de se observar a pureza das culturas e as características das colônias. As colônias isoladas (duas de cada cepa) nas placas de Ágar Baird-Parker foram repicadas para tubos com cinco mL de Caldo BHI ou Caldo Nutriente que foram incubados por 16-24 horas a  $35 \pm 2$  °C com agitação de 150 rpm.

A partir destas culturas foi coletado 1 mL e foi realizada a extração de seu DNA. De cada extração foram obtidos 400 µl de solução de DNA. Na extração de DNA foram utilizados uma centrífuga Sorvall RMC 14, um banho-maria TropiCooler Model 260014 – Boekel Scientific e um vortex Mini Vortexer MV1-VWR Scientific Products by Ika.

#### 4.3.2 Extração do DNA

Foram utilizados dois protocolos para a extração do DNA: um utilizando Kit Qiagen e outro segundo Wang, Cao e Cerniglia (1997). O primeiro foi realizado de acordo com as instruções do quadro 1. No segundo protocolo, 500 µl da cultura adicionados de 1000 µl de tampão PBS (*Phosphate-buffered Saline* – SAMBROOK, RUSSEL, 2001) foram centrifugados a 9000 rpm por 3 minutos. O sedimento foi lavado por três vezes com tampão PBS, uma vez com água milli-Q estéril e reconstituído em 50 µl de água milli-Q estéril. Após esta etapa foi realizada uma diluição 1:10 com 1% de Triton X-100 que foi fervida por 10 minutos e congelada imediatamente (quadro 2).

**Quadro 1:** Extração de DNA com o Kit Qiagen

1. Transferir 1000 µl do crescimento bacteriano (18-24h/35±2°C/agitação 200 rpm) para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Centrifugar a 7.500 rpm / 10 minutos. Desprezar o sobrenadante.
2. Ressuspender o sedimento em 180 µl do tampão de lise (*buffer ATL*) do kit Qiagen contendo 3,6 µl de lisostafina (10 mg/mL).
3. Incubar por no mínimo 30 minutos / 37°C.
4. Adicionar 20 µl de proteinase K (20 mg/mL em tampão ES) e 200 µl de tampão AL. Misturar usando vortex.
5. Incubar a 56°C por 60 minutos.
6. Adicionar 2 µl de Rnase (10 mg/mL). Incubar a 37°C por 30 minutos.
7. Centrifugar por poucos segundos (±3'').
8. Adicionar 200 µl de etanol (96-100%). Misturar no vortex pulsando por 15 segundos. Após misturar, centrifugar ligeiramente para remover as gotas que ficaram no lado interno da tampa.  
*OBS<sub>1</sub>: A adição do etanol forma um precipitado branco e é essencial aplicar todo o precipitado na coluna QIAmp.*
9. Aplicar, cuidadosamente, a mistura da etapa 8 (incluindo o precipitado) à coluna QIAmp acoplada ao tubo coletor de 2 mL sem molhar as bordas. Tampar e centrifugar a 10.000 rpm/ 1 minuto. Colocar a coluna QIAmp em um tubo coletor limpo (fornecido no kit) e descartar o tubo contendo o filtrado.  
*OBS<sub>2</sub>: Se a solução não tiver passado completamente através da membrana, centrifugar novamente a uma velocidade maior até que a solução tenha passado.*
10. Cuidadosamente, abrir a tampa da coluna e adicionar 500 µl de tampão AW1 sem molhar as bordas. Tampar e centrifugar a 10.000 rpm/1 minuto. Colocar a coluna QIAmp em um novo tubo coletor e descartar o tubo coletor contendo o filtrado.
11. Cuidadosamente, abrir a coluna QIAmp e adicionar 500 µl de tampão AW2 sem molhar as bordas. Tampar e centrifugar a 14.000 rpm/3 minutos.
12. Colocar a coluna QIAmp em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL de capacidade (não fornecido no kit) e descartar o tubo coletor contendo o filtrado. Cuidadosamente, abrir a tampa da coluna QIAmp e adicionar 200 µl de tampão AE ou água destilada. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, e então centrifugar a 10.000 rpm/ 1minuto.
13. Abrir novamente a tampa da coluna QIAmp com cuidado e adicionar 200 µl de tampão AE ou água destilada. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, e então centrifugar a 10.000 rpm/ 1minuto.
14. Armazenar o DNA extraído a -20°C.

**Quadro 2:** Protocolo de Extração de DNA segundo Wang, Cao & Cerniglia (1997)

<u>Protocolo de Extração de DNA</u>
(Wang, R. -F.; Cao, W. -W.; Cerniglia, C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in food. <b>Journal of Applied Microbiology</b> , v..83, p. 727-736, 1997. Adaptado.
CULTURA (16-24h/37°C SOB AGITAÇÃO DE 150 rpm)
0,5 mL DE CULTURA + 1,0 mL DE PBS (ESTÉRIL 0,01 MOL L <sup>-1</sup> , pH 7,4)
CENTRIFUGAR A 9000 rpm POR 3 MINUTOS
LAVAR O PRECIPITADO COM 1000 µL DE PBS POR TRÊS VEZES
LAVAR O SEDIMENTO COM 1000 µL ÁGUA
RESSUSPENDER SEDIMENTO COM 50 µL DE ÁGUA MILLI-Q ESTÉRIL
DILUIR 1:10 COM TRITON X-100 A 1% (50 µL:450 µL DE TRITON X-100)
INCUBAR EM ÁGUA FERVENTE POR 10 MINUTOS
CONGELAR IMEDIATAMENTE

#### 4.3.3 Teste de Robustez

A robustez da técnica foi testada através da variação do termociclador e dos microtubos utilizados.

Neste trabalho foi utilizado um termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler – MJ Research Inc. (Watertown, MA, USA) e microtubos de 200 µl da marca Axygen Scientific (Union City, Califórnia, USA). Para testar a robustez foram feitas três ampliações, uma utilizando microtubos de 500 µl da marca Brand, outra utilizando um termociclador GeneAmp PCR System 2400 e a terceira utilizando um outro termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler – MJ Research Inc. (Watertown, MA, USA).

#### 4.3.4 Reconstituição dos primers oligonucleotídeos

Neste trabalho foram utilizados *primers* Invitrogen (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), descritos anteriormente por Mehrotra, Wang & Johnson (2000) e apresentados na tabela 4. Na preparação da solução estoque os tubos com os *primers* foram centrifugados por alguns segundos para levar todo o DNA ao fundo do tubo. Os tubos foram abertos cuidadosamente sendo adicionado o volume apropriado de água estéril. Após dois minutos de rehidratação os tubos foram levados ao vortex por 15 segundos. Os *primers* foram reconstituídos em concentrações acima de 10µM e armazenados sob congelamento.

Na preparação das soluções de uso dos *primers* foi feita uma diluição 1:10 a partir da solução estoque.

**Tabela 4:** Seqüência de nucleotídeos, localização do gene e tamanho dos produtos da PCR para os *primers* oligonucleotídeos gene-específicos utilizados neste trabalho.

Gene <sup>a</sup>	Primer	Seqüência de Oligonucleotídeos (5' – 3')	Localização do gene	Tamanho do produto amplificado (pb)*
<i>sea</i>	IBR 1)F	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	349-368	102
	IBR 1)R	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	431-450	
<i>seb</i>	IBR 2)F	GTATGGTGGTGTAAGTACGAGC	666-685	164
	IBR 2)R	CCAAATAGTGACGAGTTAGG	810-829	
<i>sec</i>	IBR 3)F	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	432-514	451
	IBR 3)R	CACACTTTTAGAATCAACCG	863-882	
<i>sed</i>	IBR 4)F	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG	492-514	278
	IBR 4)R	ATTGGTATTTTTTTTCGTC	750-769	
<i>see</i>	IBR 5)F	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC	237-257	209
	IBR 5)R	CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	425-445	
<i>femA</i>	IBR 6)F	AAAAAAGCACATAACAAGCG	1444-1463	132
	IBR 6)R	GATAAAGAAGAAACCAGCAG	1556-1575	

\* pb = pares de bases / <sup>a</sup> A seqüência de nucleotídeos e as localizações têm origem nas publicações das seqüências por *sea* (Betley & Mekalanos, 1988), *seb* (Jones & Khan, 1986), *sec* (Bohach & Schlievert, 1987), *sed* (Bayles & Iandolo, 1989), *see* (Couch, Soltis & Betley, 1988), *femA* (Berger-Bachi *et al.*, 1989).

#### 4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Reação Multiplex PCR

As reações simplex, que foram efetuadas para testar os *primers*, e as demais reações multiplex foram feitas em um total de 50 µl e incluíram: 5 µl do DNA molde, 5 µl de tampão de reação 10X do kit da Platinum® Taq DNA Polimerase, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de solução de desoxirribonucleotídeos (dNTP) (solução estoque de 10mM cada), 20 pmol dos *primers* de *sea*, *seb*, *sec* e *see*, 40pmol do primer de *sed* e 2,5 U da Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil). O volume desta mistura foi ajustado para 50 µl com água esterilizada.

O perfil de amplificação original, do trabalho de Mehrotra, Wang & Johnson (2000) consistia em 5 minutos a 94°C para uma desnaturação inicial, 35 ciclos de 2 minutos a 94°C para a desnaturação, 2 minutos a 57°C para o anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão, finalizando com uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Para chegar-se ao perfil de amplificação utilizado nas análises das amostras foram necessárias alterações na temperatura de anelamento que variou entre 57°C, 52°C, 50°C e 48°C; no tempo de extensão, que variou entre 1 minuto, 2 minutos e 3 minutos; na concentração da solução de dNTP, que variou entre 200 µM e 300 µM; na concentração da Platinum® Taq DNA Polimerase, que variou entre 2,5 U a 3,5 U; na concentração do MgCl<sub>2</sub>, que variou entre 2mM a 3mM e, devido à dificuldade de amplificar a maior banda do controle positivo, a do gene que codifica para a enterotoxina C, também alterou-se a concentração dos primers IBR 3)F e IBR 3)R, que variou entre 0,4 pmoles/µl e 0,8 pmoles/µl.

A amplificação do DNA foi realizada em um termociclador PTC-200 - Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA), e consistiu em 5 minutos a 94°C para uma desnaturação inicial, 35 ciclos de 2 minutos a 94°C para a desnaturação, 2 minutos a 52°C para o anelamento e 3 minutos a 72°C para extensão, finalizando com uma extensão de 7 minutos a 72°C.

Os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de Ágarose a 1,5%, marcado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV.

#### 4.5 Contaminação Artificial dos Alimentos – Teste de Sensibilidade e Detecção de Bactérias Vivas

Na primeira fase as cepas produtoras das enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec* e *sed* foram inoculadas em cinco mL de Caldo Nutriente e a cepa produtora da enterotoxina *see* foi inoculada em cinco mL de Caldo BHI e, foram incubadas por 16-24 horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  com agitação de 150 rpm.

A partir destas culturas foram obtidas diluições seriadas até  $10^{-9}$  transferindo-se 1 mL da diluição precedente em caldo BHI para 9 mL do mesmo diluente. A seguir foram realizadas duas etapas (Esquema 2):

1) Para cada uma das diluições de  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  foram distribuídos volumes de 0,3, 0,3 e 0,4 mL (total 1 mL) na superfície de 12 placas de Ágar Nutriente. O inóculo foi espalhado com o auxílio de alça de Drigalsky por toda a superfície do meio. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas, em posição invertida.

Para a contagem das colônias foram selecionadas placas, da mesma diluição, que apresentaram de 30 a 300 colônias circulares, lisas, úmidas, de coloração clara.

2) Em cada um de oito erlenmeyers contendo 220 mL de Caldo Triptona Soja (TSBYE) adicionado de extrato de levedura – Wang, Cao & Cerniglia, 1997) e 25 gramas de queijo minas frescal foram adicionados mais 1 mL da diluição  $10^{-6}$  de cada cepa, 1 mL da diluição  $10^{-7}$  de cada cepa, 1 mL da diluição  $10^{-8}$  de cada cepa, 1 mL da diluição  $10^{-9}$  de cada cepa e a dois erlenmeyers não foram adicionadas culturas bacterianas.

Os erlenmeyers foram incubados por 16-24 horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  com agitação de 150 rpm (Wrist Action® Skaker. Modelo 75 – Burrell – Burrell Corporation Pittsburgh, P.A., USA). Após este período foram retirados, de cada erlenmeyer, volumes de 100µl que foram adicionados a tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo TSBYE. Os tubos foram incubados por 16-24 horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  com agitação de 150 rpm.

Após a incubação, novamente foram retirados de cada tubo volumes de 100µl que foram adicionados a tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo TSBYE. Os tubos foram incubados por 16-24 horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  com agitação de 150 rpm.

Ao final das 72 horas de incubação (erlenmeyers e tubos) foram realizadas a extração do DNA das culturas e a reação multiplex PCR. Na extração foram utilizados dois protocolos: um utilizando o Kit Qiagen e outro segundo Wang, Cao & Cerniglia (1997).

#### 4.6 Detecção das bactérias diretamente no queijo minas frescal

Seis erlenmeyers foram preparados: 1 e 2: 220 mL de caldo TSBYE, 25 gramas de queijo minas frescal e 1 mL do crescimento bacteriano de 24 horas de cada uma das cepas de referência (total 5 mL); 3 e 4: 220 mL de caldo TSBYE e 25 gramas de queijo minas frescal; 5 e 6: 220 mL de caldo TSBYE e 1 mL do crescimento bacteriano de 24 horas de cada uma das cepas de referência (total 5 mL). A seguir foram realizados dois procedimentos (Esquema 3):

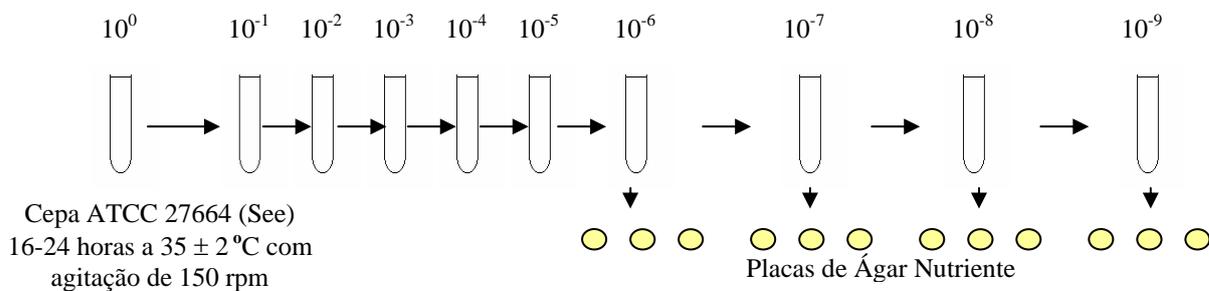
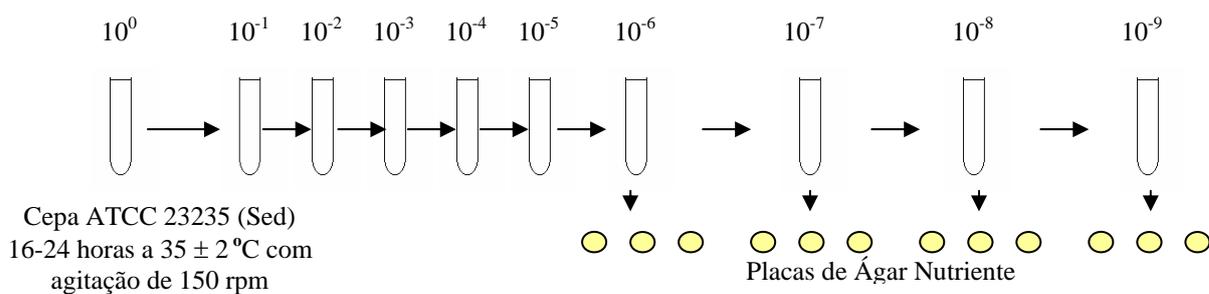
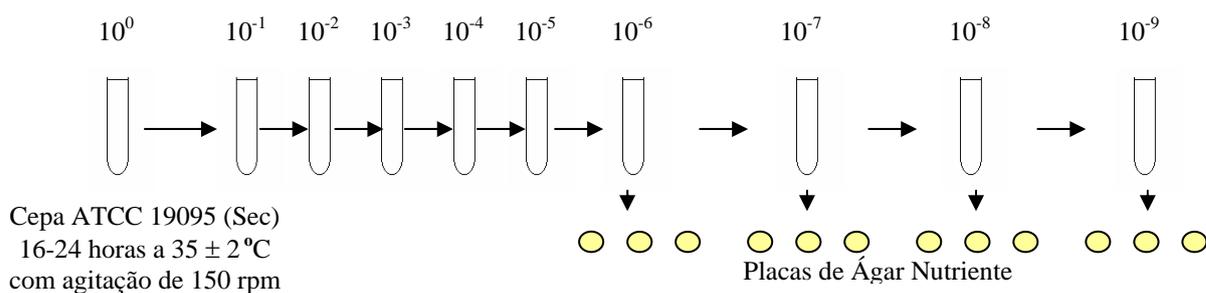
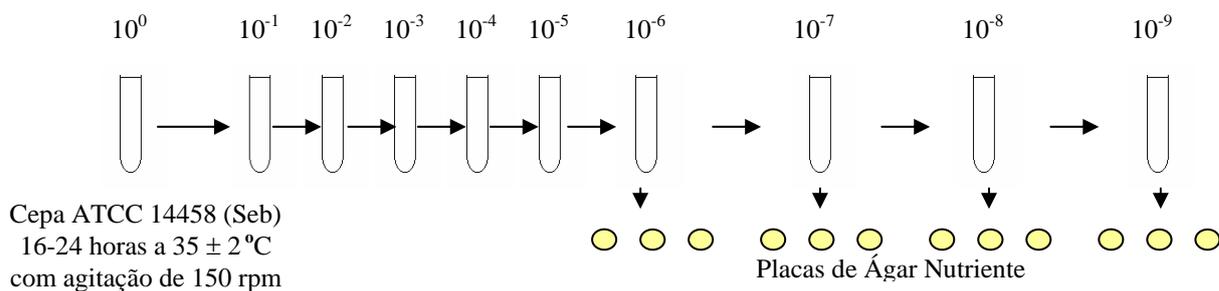
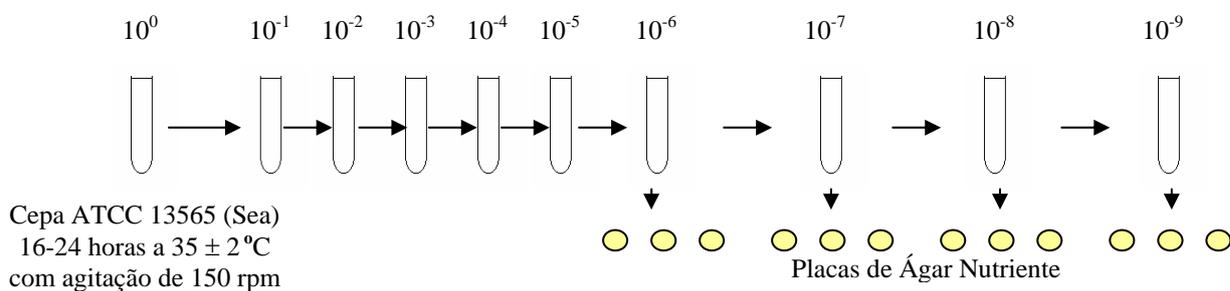
1) Os erlenmeyers foram incubados por 16-24 horas a  $35 \pm 2$  °C com agitação de 150 rpm. Após cada período de 24 horas de incubação foram retirados, de cada erlenmeyer, volumes de 100µl que foram adicionados a tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo TSBYE. Este procedimento foi realizado três vezes.

Os tubos foram incubados por 16-24 horas a  $35 \pm 2$  °C com agitação de 150 rpm. Ao final, foram realizadas a extração do DNA das culturas e a reação multiplex PCR. Na extração foram utilizados dois protocolos: um utilizando o Kit Qiagen e outro segundo Wang, Cao e Cerniglia (1997).

2) Volumes de 0,5 mL e 1 mL foram retirados após 24 e 48 horas de incubação, para posterior extração do DNA e reação multiplex PCR. Na extração foram utilizados dois protocolos: um utilizando o Kit da Qiagen e outro segundo Wang, Cao e Cerniglia (1997).

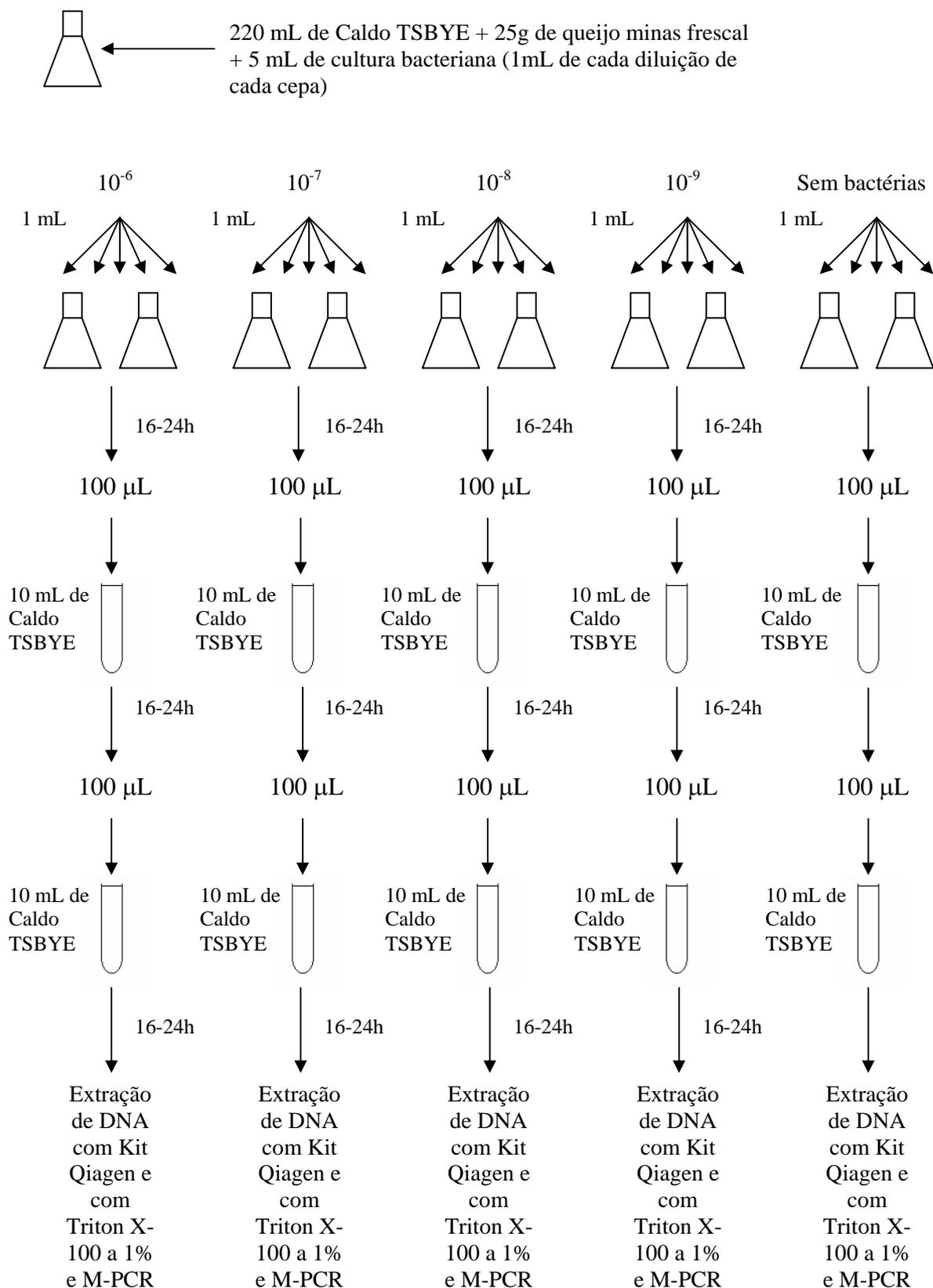
**Esquema 2:** Contaminação Artificial dos Alimentos – Teste de Sensibilidade e Detecção de Bactérias Vivas - continuação (Ercolini *et al.*, 2004).

1ª etapa:



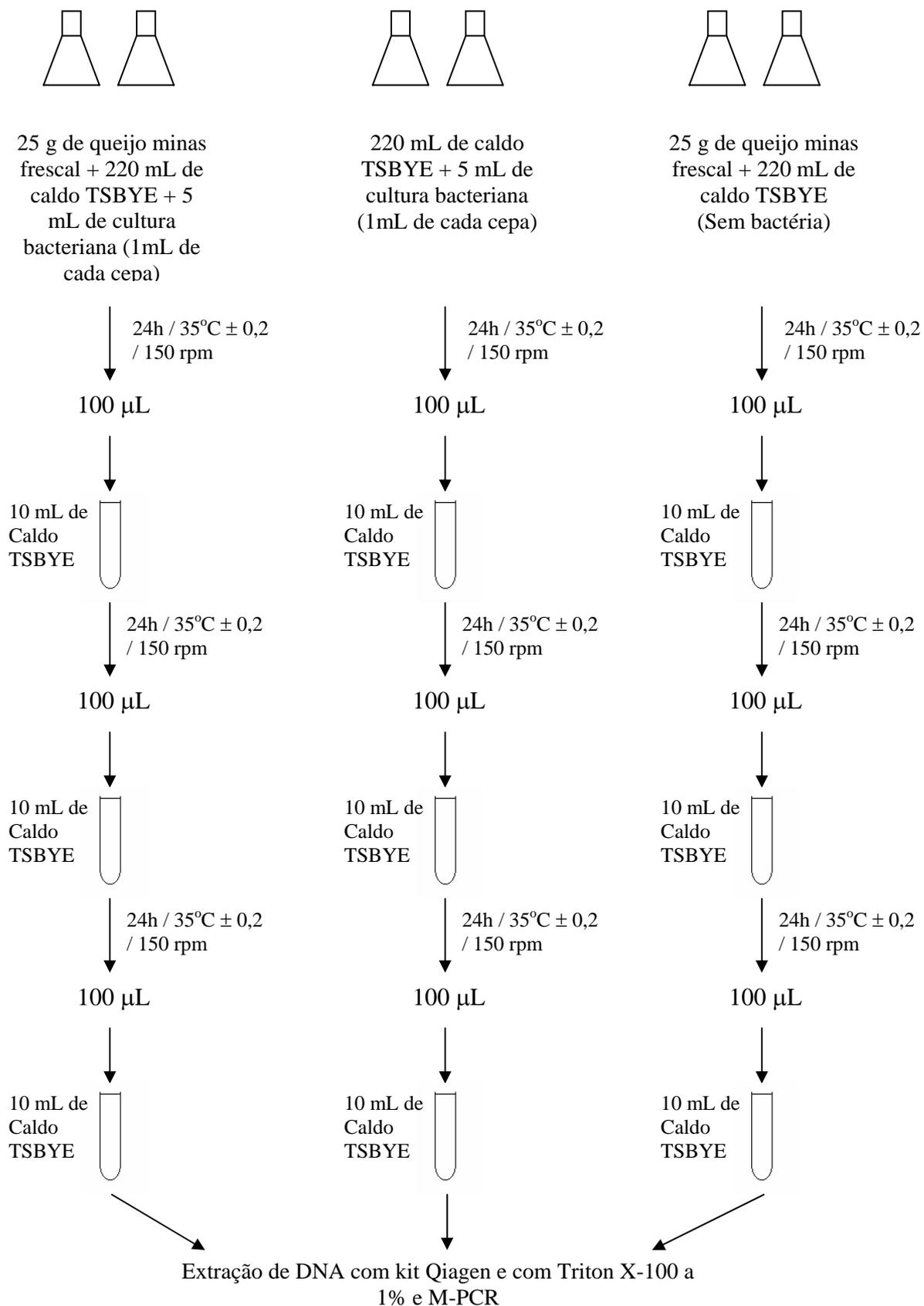
**Esquema 2:** Contaminação Artificial dos Alimentos – Teste de Sensibilidade e Detecção de Bactérias Vivas (desenvolvido neste trabalho).

2ª etapa:



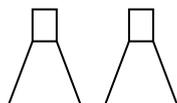
**Esquema 3:** Detecção das Bactérias Diretamente do Queijo Minas Frescal (desenvolvido neste trabalho).

1ª procedimento:



**Esquema 3:** Detecção das Bactérias Diretamente do Queijo Minas Frescal (desenvolvido neste trabalho).

2ª procedimento:

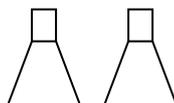


25 g de queijo minas frescal + 220 mL de caldo TSBYE + 5 mL de cultura bacteriana (1mL de cada cepa)

24h / 35°C  
± 0,2  
/ 150 rpm

48h / 35°C  
± 0,2  
/ 150 rpm

Extração de DNA com kit Qiagen e com Triton X-100 a 1% e M-PCR

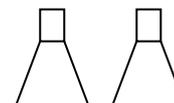


220 mL de caldo TSBYE + 5 mL de cultura bacteriana (1mL de cada cepa)

24h / 35°C  
± 0,2  
/ 150 rpm

48h / 35°C  
± 0,2  
/ 150 rpm

Extração de DNA com kit Qiagen e com Triton X-100 a 1% e M-PCR



25 g de queijo minas frescal + 220 mL de caldo TSBYE (Sem bactéria)

24h / 35°C  
± 0,2  
/ 150 rpm

48h / 35°C  
± 0,2  
/ 150 rpm

Extração de DNA com kit Qiagen e com Triton X-100 a 1% e M-PCR

## 5 Resultados

---

### 5.1 Pesquisa de Estafilococos Coagulase-positiva – Isolamento

Trinta amostras de queijo minas frescal, pesando no mínimo 200g cada, de três marcas comerciais (10 de cada) foram compradas em supermercados de regiões do Estado do Rio de Janeiro em três períodos diferentes. Destas, 10 amostras não apresentaram nenhum crescimento microbiano. Das 20 amostras que apresentaram crescimento foram isoladas 231 colônias, cujas características morfotintoriais foram verificadas através da coloração de Gram. Aquelas que apresentaram cocos Gram-positivos agrupados em forma de cachos foram submetidas ao teste da catalase (tabela 5). Para o teste da coagulase foram selecionadas 151 colônias, das quais nove (6%) foram coagulase-negativas. Na identificação visual dos estafilococos foram observadas variantes das colônias coagulase-positiva: colônias circulares, lisas, úmidas, com variação na coloração (cinza escuro a negro), nos tipos de halos (transparentes, duplos, opacos ou brancos) e no tamanho (colônias pequenas e médias).

**Tabela 5:** Características morfotintoriais, teste da catalase e coagulase das colônias isoladas de 20 amostras de queijos minas frescal.

	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>	<i>Total</i>
<i>Coloração de Gram</i>	231	0	231
<i>Catalase</i>	231	0	231
<i>Coagulase</i>	142	9	151

Os resultados da pesquisa de estafilococos coagulase-positiva nas trinta amostras de queijos minas frescal (tabela 6) mostraram que 33,34% (amostras 6 - 10 e 16 - 20) das amostras não apresentaram nenhum crescimento microbiano nas placas de Ágar Baird-Parker. Cerca de 6,67% (amostras 11 e 15) continham estafilococos coagulase-positiva dentro do limite estabelecido pela RDC nº 12, que é de  $5 \times 10^2$  UFC/g. Das amostras que se apresentaram em desacordo com o limite estabelecido pela legislação (40%), 13,33% (amostras 14, 25, 27 e 28) apresentaram valores entre  $5 \times 10^2$  e  $10^3$  UFC/g, 16,66% (amostras 1, 2, 3, 4 e 5) apresentaram valores entre  $10^3$  e  $10^4$  UFC/g e 10% apresentaram

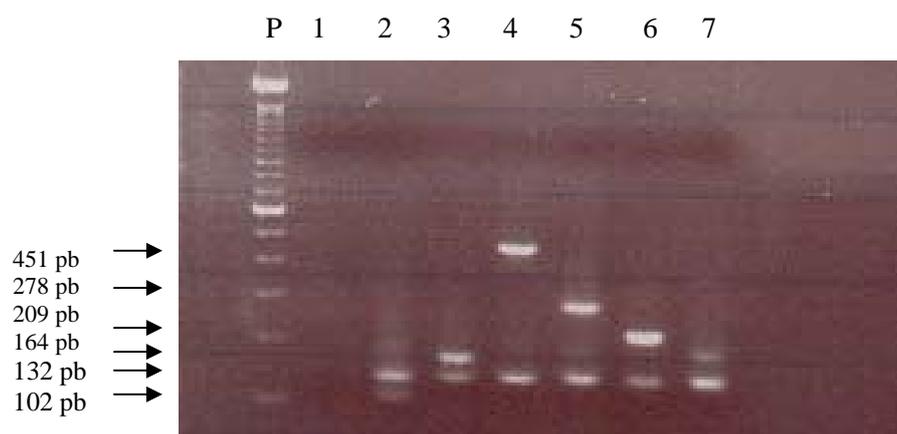
valores acima de  $10^5$  UFC/g (amostras 21, 22 e 30) o que, segundo o FDA (1998), é suficiente para a produção de enterotoxinas. Seis amostras (20%) não foram testadas para coagulase.

**Tabela 6:** Pesquisa de estafilococos coagulase-positiva em 30 amostras de queijos minas frescal – Isolamento.

<i>Estafilococos Coagulase-positiva/g de queijo</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
ufc/g		
0	10	33,34
$\geq 10^0 - 10^2$	2	6,67
$> 5 \times 10^2 - 10^3$	4	13,33
$> 10^3 - 10^4$	5	16,66
$> 10^5$	3	10
Não testadas	6	20
Total	30	100

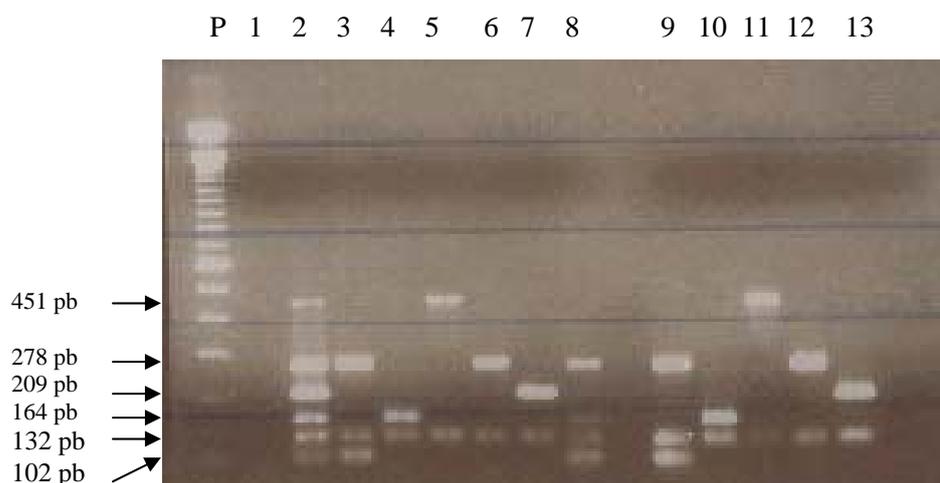
## 5.2 Padronização do protocolo de Multiplex PCR

Reações simplex e reações duplex foram realizadas para testar os primers reconstituídos e para verificar a eficácia do protocolo multiplex PCR na amplificação dos genes alvo. Os produtos desta multiplex mostraram que o protocolo é eficaz e que não houve problemas na amplificação com o uso destes *primers* (Figura 1).



**Figura 1:** Duplex PCR para detecção dos genes *sea* (102 pb), *seb* (164 pb), *sec* (451 pb), *sed* (278 pb), *see* (209 pb) e *femA* (132 pb) das cepas de *Staphylococcus aureus* de referência. Gel de Ágarose a 1,5%: Pista P: DNA padrão de 100 pb (Invitrogen Inc., Valencia, CA, USA); pista 1: controle negativo (Mix + água); pista 2: *sea* + *femA*; pista 3: *seb* + *femA*; pista 4: *sec* + *femA*; pista 5: *sed* + *femA*; pista 6: *see* + *femA*; pista 7: *femA*.

A partir das culturas das cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 (*sea*), ATCC 14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), ATCC 23235 (*sed*), ATCC 27664 (*see*) foi realizada a extração do DNA com o kit Qiagen e conforme o protocolo de Wang, Cao e Cerniglia (1997). Reações multiplex PCR foram realizadas com os DNAs extraídos pelos dois protocolos e os resultados demonstraram não haver diferenças entre os métodos de extração (Figura 2).



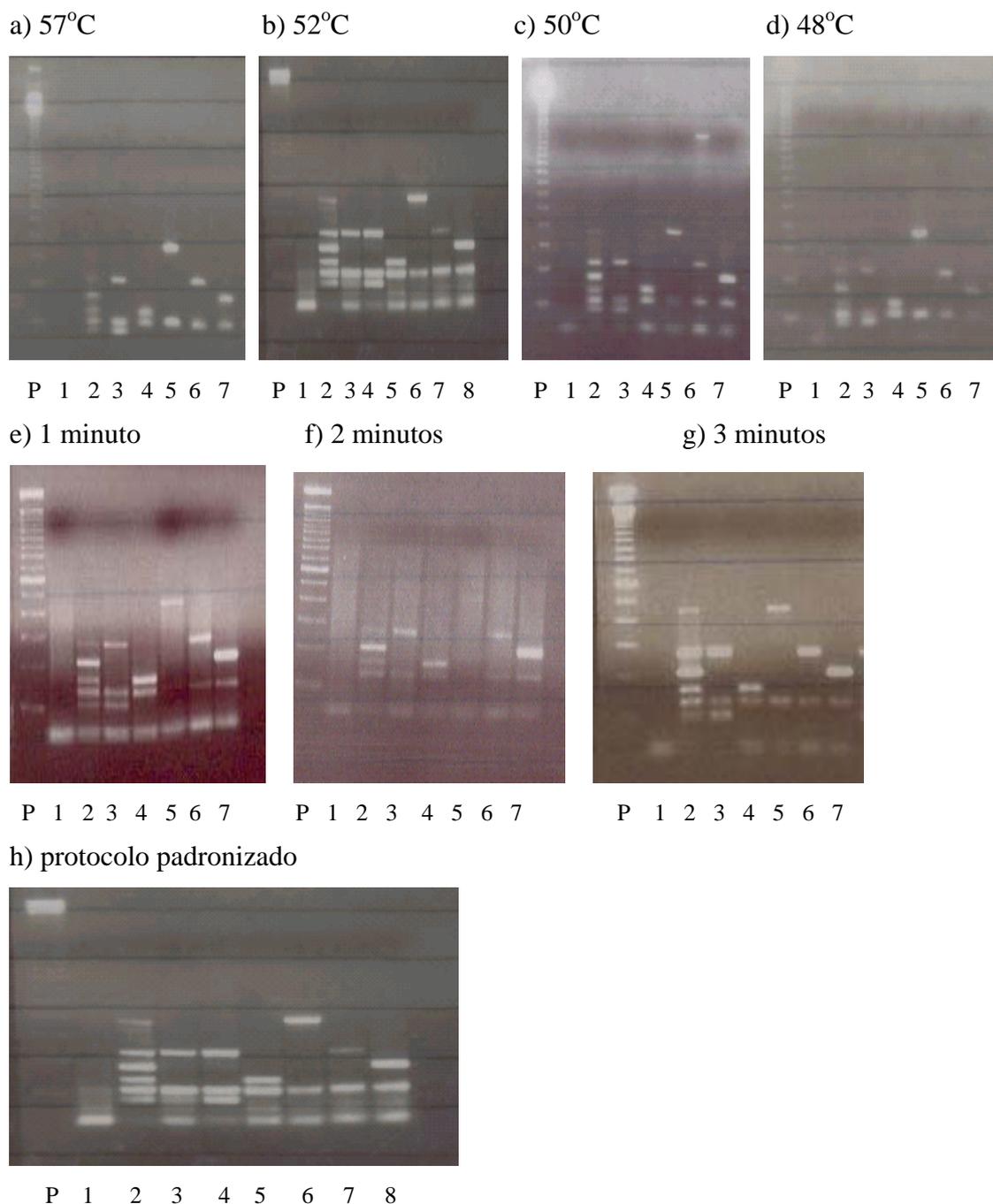
**Figura 2:** Multiplex PCR para detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *femA* das cepas de *Staphylococcus aureus*. Extração com o kit Qiagen e pelo protocolo de Wang, Cao & Cerniglia (1997). Gel de Ágarose a 1,5%: Pista P: DNA padrão de 100 pb (Invitrogen Inc., Valencia, CA, USA); Pistas 1 a 8: extração segundo Wang, Cao & Cerniglia (1997) - pista 1: controle negativo (Mix + água); pista 2: controle positivo (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *femA*); pista 3: *sea* + *sed* + *femA*; pista 4: *seb* + *femA*; pista 5: *sec* + *femA*; pista 6: *sed*+ *femA*; pista 7: *see* + *femA*; pista 8: cultura das cinco cepas inoculadas juntas; Pistas 9 a 13: extração com kit Qiagen – pista 9: *sea* + *sed* + *femA*; pista 10: *seb* + *femA*; pista 11: *sec* + *femA*; pista 12: *sed*+ *femA*, pista 13: *see* + *femA*. Tamanhos dos produtos amplificados: *sea*: 102 pb, *seb*: 164 pb, *sec*: 451 pb, *sed*: 278 pb, *see*: 209 pb e *femA*: 132 pb.

Na busca pela amplificação dos produtos da PCR, o protocolo original, do trabalho de Mehrotra, Wang & Johnson (2000), foi alterado em vários parâmetros (Quadro 3). O primeiro parâmetro alterado foi a temperatura de anelamento, que segundo os autores deveria ser de 57°C. Porém, várias temperaturas (57°C, 52°C, 50°C e 48°C) foram testadas para alcançar a amplificação da banda do gene da enterotoxina C - *sec* (451 pb), o que só foi obtido com a temperatura de 52°C. O tempo de extensão também variou entre 1, 2 e 3 minutos, sendo o tempo de 3 minutos ideal para a amplificação do gene da *sec*. A concentração da solução de dNTP também foi alterada, variando entre 200 µM e 300 µM, sendo que no protocolo padronizado utilizou-se a concentração de 200 µM.

A concentração da Platinum® *Taq* DNA Polimerase variou entre 2,5 U a 3,5 U, mas o protocolo foi padronizado com uma concentração de 2,5 U, o que significa uma concentração final na reação de 0,05 U/µl. Também variaram a concentração do MgCl<sub>2</sub>, que variou entre 2mM a 3mM, sendo adequada a concentração de 2mM e, a concentração dos primers IBR 3)F e IBR 3)R, específicos para o gene da *sec*, entre 0,4 pmoles/µl e 0,8

pmoles/ $\mu$ l. Não foram observadas melhorias na amplificação com o aumento da concentração destes *primers*, sendo assim, no protocolo padronizado utilizou-se a concentração de 0,4 pmoles/ $\mu$ l.

O perfil de amplificação padronizado consistiu em 5 minutos a 94°C para uma desnaturação inicial, 35 ciclos de 2 minutos a 94°C para a desnaturação, 2 minutos a 52°C para o anelamento e 3 minutos a 72°C para extensão, finalizando com uma extensão de 7 minutos a 72°C.

**Quadro 3:** Padronização do protocolo de multiplex PCR

**Fotos:** Padronização da Multiplex PCR. *a, b, c, d*: produtos da amplificação com temperaturas de anelamento de 57°C, 52°C, 50°C e 48°C, respectivamente; *e, f, g*: produtos da amplificação com tempos de extensão de 1, 2 e 3 minutos, respectivamente; *h*: protocolo padronizado: 5 minutos a 94°C para uma desnaturação inicial, 35 ciclos de 2 minutos a 94°C para a desnaturação, 2 minutos a 52°C para o anelamento e 3 minutos a 72°C para extensão, finalizando com uma extensão de 7 minutos a 72°C, concentração de dNTPs a 200 µM, concentração da Platinum *Taq* polimerase a 2,5 U, concentração do MgCl<sub>2</sub> a 2 mM e concentração dos primers IBR 3)F e IBR 3)R a 0,4 pmoles/µl. Pista P: DNA padrão de 100 pb (Invitrogen Inc., Valencia, CA, USA); pista 1: controle negativo (Mix + água); pista 2: controle positivo (*sea, seb, sec, sed, see, femA*); pista 3: *sea + sed + femA*; pista 4: *sea + sed + femA*; pista 5: *seb + femA*; pista 6: *sec + femA*; pista 7: *sed + femA*; pista 8: *see + femA*.

### 5.3 Teste de Robustez da técnica

A robustez da técnica foi testada através da variação do termociclador e dos microtubos utilizados (Quadro 4). Três termocicladores foram utilizados: dois termocicladores PTC-200 Peltier Thermal Cycler – MJ Research Inc. (Watertown, MA, USA) e um termociclador GeneAmp PCR System 2400. Não foram observadas diferenças nos produtos das ampliações feitas nos três equipamentos, o que confirma a robustez da técnica.

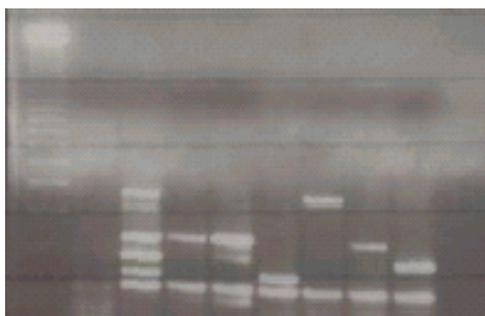
Microtubos de 200 µl da marca Axygen Scientific (Union City, Califórnia, USA) e microtubos de 500 µl da marca Brand também foram testados. Novamente não foram observadas diferenças nas ampliações.

#### Quadro 4: Teste de robustez

a) P 1 2 3 4 5 6 7 8    b) P 1 2 3 4 5 6 7 8    c) P 1 2 3 4 5 6 7 8



d) P 1 2 3 4 5 6 7 8



e) P 1 2 3 4 5 6 7 8



**Fotos:** Multiplex PCR para detecção dos genes *sea* (102 pb), *seb* (164 pb), *sec* (451 pb), *sed* (278 pb), *see* (209 pb) e *femA* (132 pb) das cepas de *Staphylococcus aureus* de referência. Gel de Ágarose a 1,5%: Pista P: DNA padrão de 100 pb (Invitrogen Inc., Valencia, CA, USA); pista 1: controle negativo (Mix + água); pista 2: controle positivo (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *femA*); pista 3: *sea* + *sed* + *femA*; pista 4: *sea* + *sed* + *femA* ; pista 5: *seb* + *femA*; pista 6: *sec* + *femA*; pista 7: *sed* + *femA*; pista 8: *see* + *femA*. Foto a: termociclador PTC 200 – Peltier Thermal Cycler – MJ Research 1; foto b: termociclador Gene Amp PCR System 2400; foto c: termociclador PTC 200 –

Peltier Thermal Cycler – MJ Research 2; foto d: microtubos de 500 µl da marca Brand; foto e: microtubos de 200 µl da marca Axygen Scientific (Union City, Califórnia, USA).

#### 5.4 Contaminação artificial e Detecção das bactérias diretamente no queijo minas frescal

As etapas da contaminação artificial do queijo minas frescal e da detecção direta dos genes que codificam para as enterotoxinas A, B, C, D e E foram realizadas. O DNA das culturas foi extraído com o kit Qiagen e pelo protocolo de Wang, Cao e Cerniglia (1997). Na contaminação artificial comprovou-se que o melhor método de extração foi com o kit da Qiagen.

Na 1ª etapa de contaminação artificial dos alimentos os números de células viáveis na contagem de colônias das culturas puras inoculadas em placas de Ágar Nutriente foram: da ordem de  $10^2$  UFC/ml nas diluições de  $10^{-6}$ , da ordem de  $10^1$  a  $10^2$  UFC/ml nas diluições de  $10^{-7}$  e 1 a  $10^1$  UFC/ml nas diluições de  $10^{-8}$  e  $10^{-9}$ .

Na 2ª etapa da contaminação artificial, em que as diluições  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-9}$  de cada uma das cepas foram inoculadas juntamente com as amostras de queijo minas frescal, a Multiplex PCR foi negativa. Dos seis genes desejados, somente o gene da enterotoxina D foi amplificado, cuja contagem de células viáveis foi da ordem de 2,0 UFC/ml a  $2,7 \times 10^2$  UFC/ml, ou seja, a sensibilidade da multiplex PCR para este gene foi de < 10 a 100 células.

A amplificação dos produtos da multiplex PCR na detecção direta dos queijos minas frescal mostrou-se ineficaz na amplificação de todos os genes alvo (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *femA*).

Estes dados mostraram que para o queijo minas frescal é necessário primeiramente a realização do isolamento de colônias de estafilococos coagulase-positiva para só então procedermos a extração de DNA, com o kit Qiagen, e a multiplex PCR.

#### 5.5 Distribuição dos genes *sea*, *seb*, *sed* e *femA* nas colônias isoladas de 20 amostras de queijos minas frescal

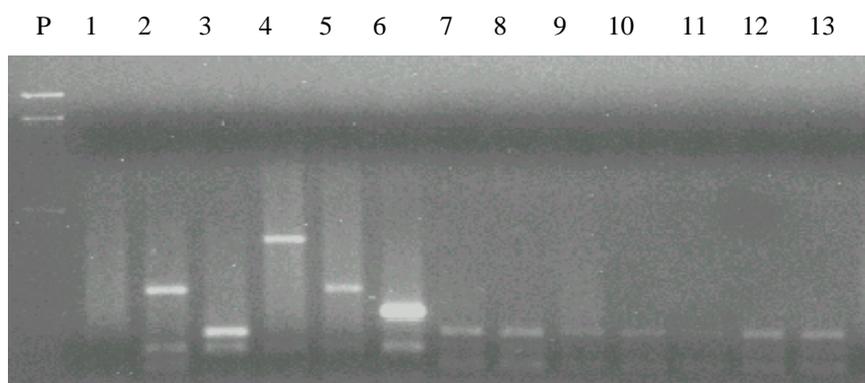
Das 111 colônias, sete foram de estafilococos coagulase-negativa e 104 foram de estafilococos coagulase-positiva. O DNA foi extraído com o Kit Qiagen e posteriormente foi realizada a Multiplex PCR.

Das 111 colônias isoladas das amostras 2, 3, 5, 11, 21, 22, 25, 27, 28 e 30 analisadas pela Multiplex PCR, 34 (30,62%) foram positivas para algum dos cinco genes de enterotoxinas pesquisados (Figura 3). Destas 34 colônias, 15 (13,51%) foram positivas para *femA*, *sea* e *seb*, 5 (4,5%) foram positivas para *sea*, 9 (8,11%) foram positivas para *sea* e *seb*, 2 (1,8%) foram positivas para *sed* e 3 (2,7%) foram positivas para *femA* e *sed*. Trinta e nove (35,14%) amplificaram somente o gene *femA* e nenhum gene das enterotoxinas (Figura 4), e 38 (34,24%) foram negativas para todos os genes (Tabela 7).

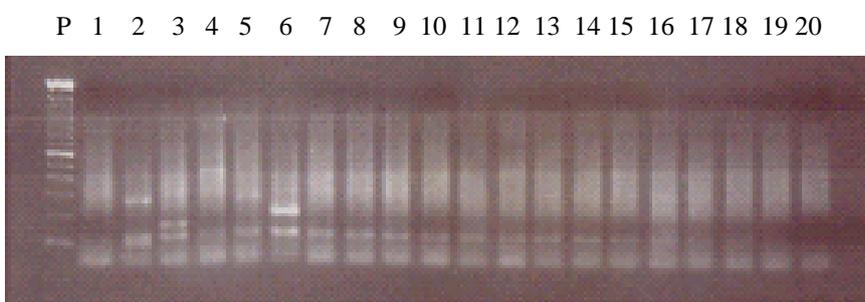
**Tabela 7:** Distribuição dos genes *femA*, *sea*, *seb* e *sed* de *Staphylococcus aureus* nos 111 isolados

Gene	Nº	%
<i>femA</i>	39	35,14
<i>femA</i> + <i>sea</i> + <i>seb</i>	15	13,51
<i>sea</i>	5	4,50
<i>sea</i> + <i>seb</i>	9	8,11
<i>sed</i>	2	1,80
<i>femA</i> + <i>sed</i>	3	2,70
nenhuma	38	34,24
Total	111	100

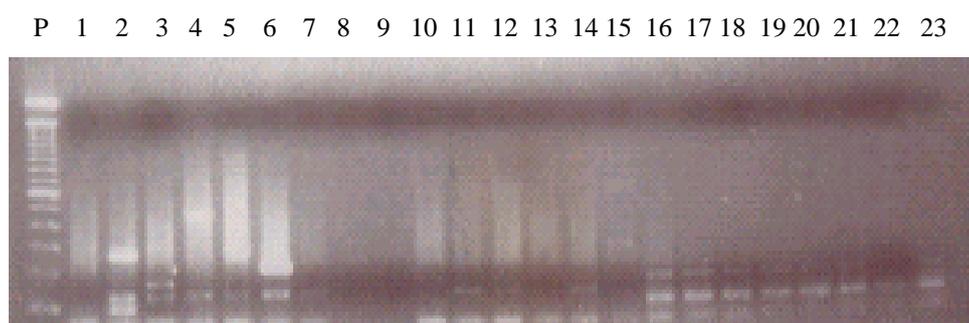
Entre os sete estafilococos coagulase-negativa analisados pela Multiplex PCR, quatro foram negativos, um foi positivo para *femA* e *sed* e dois foram positivos somente para *sed*.



**Figura 3:** Multiplex PCR em isolados de *Staphylococcus aureus* de queijos minas frescal (amostra 30). Gel de Ágarose a 1,5%: Pista P: DNA padrão de 100 pb (Invitrogen Inc., Valencia, CA, USA); pista 1: controle negativo; pistas 2 - 6: cepas de referência : pista 2: *sea + femA*; pista 3: *seb + femA* ; pista 4: *sec + femA*; pista 5: *sed + femA*; pista 6: *see + femA*; pistas 7 – 13: colônias 1 a 7.



**Figura 4:** Multiplex PCR em isolados de *Staphylococcus aureus* de queijos minas frescal (amostra 5). Gel de Ágarose a 1,5%: Pista P: DNA padrão de 100 pb (Invitrogen Inc., Valencia, CA, USA); pista 1: controle negativo; pistas 2 - 6: cepas de referência: pista 2: *sea + femA*; pista 3: *seb + femA* ; pista 4: *sec + femA*; pista 5: *sed + femA*; pista 6: *see + femA*; pistas 7 – 20: colônias 1 a 14.



**Figura 5:** Multiplex PCR em isolados de *Staphylococcus aureus* de queijos minas frescal (amostras 25 e 28). Gel de Ágarose a 1,5%: Pista P: DNA padrão de 100 pb (Invitrogen Inc., Valencia, CA, USA); pista 1: controle negativo; pistas 2 - 6: cepas de referência: pista 2: *sea + femA*; pista 3: *seb + femA* ; pista 4: *sec + femA*; pista 5: *sed + femA*; pista 6: *see + femA*; pistas 7 – 23: colônias 1 a 17.

## 6 Discussão

---

O queijo minas frescal é muito consumido pela população brasileira e seu processo de fabricação é, essencialmente, nacional. Devido a sua alta umidade (43 - 55%) o queijo minas é susceptível a alterações proteolíticas e microbiológicas. Além disso, os leites crus ou pasteurizados e os queijos têm sido freqüentemente implicados como veículos de transmissão de bactérias patogênicas e com surtos de intoxicações estafilocócicas relatados em todo o mundo (DE LUCA, ZANETTI & STAMPI, 1997; ALMEIDA FILHO & NADER FILHO, 2000; LOGUERCIO, & ALEIXO, 2001; CARMO *et al.*, 2002; ARAÚJO *et al.*, 2002; NORMANNO *et al.*, 2005).

Das 30 amostras de queijo minas frescal analisadas neste trabalho, 12 (40%) apresentaram contagens de estafilococos coagulase-positiva acima de  $5 \times 10^2$  UFC/g, valor este estabelecido como limite máximo permitido pela ANVISA para o queijo minas frescal (BRASIL, 2001). Tais resultados mostraram-se similares aos obtidos por Carmo *et al.* (2002) e Almeida Filho & Nader Filho (2000) que encontraram valores em torno de  $10^5$  UFC/g, e aos achados por Loguercio & Aleixo (2001) e por Araújo *et al.* (2002) que observaram contagens entre  $10^3$  e  $10^4$  UFC/g. Estes autores destacaram como possíveis causas da contaminação as condições insatisfatórias dos utensílios, a manipulação e o processo de pasteurização inadequado e o uso do leite cru pelo pequeno produtor. Casualmente, o armazenamento sob as altas temperaturas ambientais de nosso País, que permitem o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp., pode estimular a produção de enterotoxinas estafilocócicas no queijo minas frescal. Toshkova *et al.* (2001) e Vautor *et al.* (2005) analisaram a relação dos portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* com a ocorrência de infecções estafilocócicas. Eles concluíram que os portadores têm um importante papel na manutenção e na disseminação desses microrganismos, especialmente os profissionais de saúde e os manipuladores de alimentos.

Das 30 amostras examinadas, 10% apresentaram valores acima de  $10^5$  UFC/g, o que é preocupante principalmente pelo fato destes valores estarem na faixa requerida ( $10^5$  UFC/g a  $10^9$  UFC/g) pelas cepas enterotoxigênicas para a produção de enterotoxinas; e em quantidades suficientes e necessárias para a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (FDA, 1998). De Buyser *et al.* (2001) estimaram a proporção de doenças de origem alimentar devido ao consumo de leite e produtos laticínios registrados na França e em outros países industrializados. Dados mostraram que na Inglaterra vários surtos documentados tiveram como veículo de transmissão o leite e queijos, o que foi confirmado pelo isolamento de *Staphylococcus aureus*. No Brasil, poucos surtos de intoxicações

alimentares estafilocócicas por contaminação de queijo minas frescal têm sido registrados, entre eles estão os estudos de Sabioni, Hirooka & Souza (1988), de Pereira *et al.* (1991) e de Carmo *et al.* (2002).

A identificação visual dos estafilococos isolados das amostras de queijo minas frescal apresentou muitas variantes, como a variação da coloração das colônias (cinza escuro a negro), dos tipos de halos (transparentes, duplos, opacos ou brancos) e do tamanho das colônias (pequenas e médias), o que tornou o diagnóstico trabalhoso e passível de falhas. Este fato também foi observado por Nascimento, Corbia e Nascimento (2001) que relacionaram estas diferentes características à variação fisiológica e/ou genética das cepas de *S. aureus* presentes nos alimentos tornando a identificação destes e dos *Staphylococcus* spp. coagulase-positiva impossível de ser realizada sem a confirmação por testes bioquímicos ou testes complementares (BAIRD-PARKER, 1990; LANCETTE & TATINI, 1992). Neste trabalho, o teste complementar utilizado foi a multiplex PCR com amplificação do gene *femA*, específico para *S. aureus*.

Na padronização da Multiplex PCR vários parâmetros foram alterados, como a temperatura de anelamento, o tempo de extensão, a concentração da solução de dNTP, *primers*, MgCl<sub>2</sub> e *Taq* polimerase. O mesmo fato foi relatado por Nájera-Sánchez *et al.* (2003) que testaram várias temperaturas de anelamento. Assim como neste trabalho, eles observaram que baixas temperaturas de anelamento (48°C e 50°C) resultaram em reduzida sensibilidade e especificidade do gene alvo por causa da competição entre os produtos não-específicos pelos componentes da reação. Todavia, Henegariu *et al.* (1997) observaram que para amplificar os *loci* em misturas multiplex foi necessário baixar a temperatura de anelamento em 4 – 6°C, o que está de acordo com estes resultados, visto que no protocolo original de Mehrotra, Wang & Johnson (2000) a temperatura de anelamento era de 57°C. Porém, em nosso protocolo padronizado a temperatura ideal para amplificação das seis bandas foi de 52°C, ou seja, com menos 5°C.

Henegariu *et al.* (1997) amplificaram mais de 50 *loci* em várias combinações de multiplex PCR para avaliar a influência destes mesmos parâmetros nas reações. Eles concluíram que na multiplex PCR, como mais de um *loci* é simultaneamente amplificado, o *pool* da enzima e dos nucleotídeos (dNTP) torna-se um fator limitante, e um tempo maior é necessário para que as moléculas de polimerase completem a síntese de todos os produtos. Os resultados mostraram que o aumento do tempo de extensão na multiplex PCR aumentou o rendimento dos produtos da PCR de maior fragmento, ou seja, visivelmente altos rendimentos dos produtos da PCR foram obtidos quando um tempo de extensão maior foi utilizado. Estes dados estão de acordo com os achados neste trabalho, visto que a

amplificação da maior banda (gene da enterotoxina C – *sec* - 451 pb) só foi obtida com o aumento do tempo de extensão para 3 minutos. Estes mesmos autores também concluíram que os melhores resultados da multiplex PCR foram obtidos quando utilizaram uma concentração de 200 a 400  $\mu$ M de solução de dNTP e de 10,8 mM de MgCl<sub>2</sub>. Estes resultados estão em desacordo com este trabalho, já que melhores resultados foram obtidos com uma concentração de 200  $\mu$ M de solução de dNTP e de 2mM de MgCl<sub>2</sub>.

Na 1ª etapa da contaminação artificial dos alimentos os números de células viáveis da contagem de colônias a partir das culturas puras inoculadas em placas de Ágar Nutriente foram da ordem de 10<sup>2</sup> UFC/ml nas diluições de 10<sup>-6</sup>, da ordem de 10<sup>1</sup> a 10<sup>2</sup> UFC/ml nas diluições de 10<sup>-7</sup> e 1 a 10<sup>1</sup> UFC/ml nas diluições de 10<sup>-8</sup> e 10<sup>-9</sup>. Tais resultados estão de acordo com Wang, Cao & Johnson (1991), Wang, Cao & Johnson (1992a), Wang, Slavik & Cao (1992b), Wang *et al.* (1993a), Wang *et al.* (1993b), Wang *et al.* (1994a), Wang *et al.* (1994b), Wang, Cao & Cerniglia (1996a), Wang *et al.* (1996b), Wang *et al.* (1996c) e Slavik *et al.* (1993), cuja sensibilidade da PCR para culturas puras para a maioria das bactérias também foi de 100 células; todavia, em desacordo com o estudo de Wang, Cao & Cerniglia (1997) onde a sensibilidade da PCR variou entre 10<sup>4</sup> e 10<sup>7</sup> células.

É importante ressaltar que tanto na contaminação artificial como na detecção direta nos alimentos as cinco cepas foram inoculadas todas juntas no meio de cultura TSBYE. Este fato não foi observado em nenhum outro experimento dos demais trabalhos, que sempre inocularam as diferentes cepas separadamente. Neste estudo, este procedimento rendeu resultados negativos para a multiplex PCR, o que pode ser devido à interferência no crescimento de uma cepa por outra.

Na 2ª etapa da contaminação artificial, em que as diluições 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> e 10<sup>-9</sup> de cada uma das cepas foram inoculadas juntamente com as amostras de queijo minas frescal, a multiplex PCR foi negativa. Somente o gene da enterotoxina D foi amplificado e a sensibilidade da multiplex PCR foi de 1 a 100 células. Tal resultado diverge dos resultados encontrados por Tamarapu *et al.* (2001) que detectaram os genes *nuc* e *sec* de *S. aureus* em amostras de leite desnatado e queijo tipo cheddar, através de uma multiplex PCR. As amostras foram contaminadas artificialmente com diluições seriadas de *S. aureus* que variaram de 10<sup>0</sup> a 10<sup>-8</sup> UFC/ml, e os produtos da reação foram observados nas diluições de 10<sup>-8</sup> a 10<sup>-2</sup> UFC/mL para o leite desnatado e na diluição 10<sup>-2</sup> UFC/20g para o queijo.

Na detecção direta dos queijos minas frescal somente bandas inespecíficas foram amplificadas. Este resultado está em desacordo com Ercolini *et al.* (2004) que detectaram através de reações de PCR os genes das enterotoxinas SEG e SEH diretamente de leite cru artificialmente contaminado. Eles também testaram a PCR com amostras de leite cru

contaminadas artificialmente e incubadas por 24 e 48 horas em meio de cultura de enriquecimento. Os resultados mostraram que após 48 horas de enriquecimento todos os genes alvo (*sec*, *seg*, *seh* e *sei*) foram amplificados.

Resultado semelhante ao nosso foi encontrado por McLauchlin *et al.* (2000) que contaminaram artificialmente amostras de sopa de cogumelos enlatada, creme de leite, queijo cotage, queijo mussarela, queijo gordo e presunto fatiado. Uma sensibilidade de 4 a 40 UFC de *S. aureus* foi alcançada na sopa e no presunto contaminados artificialmente. Porém, a detecção de genes das enterotoxinas foi fraca ou não foi obtida nos quatro produtos laticínios (queijos e creme de leite). Após a incubação a 37°C, o crescimento do microrganismo inoculado foi detectado na sopa, no creme de leite e no presunto; algum crescimento foi detectado no queijo mussarela e no queijo gordo; células não-viáveis de *S. aureus* foram obtidas do queijo cotage. Uma variedade de diferentes cepas de *S. aureus* foi utilizada na inoculação da sopa e a amplificação dos genes de enterotoxinas de todas elas foi alcançada. Na sopa, no creme de leite e no presunto, os genes de enterotoxinas apropriados foram detectados, sendo que o creme de leite apresentou a detecção mais fraca. SEA e SED foram detectadas no queijo gordo e SEA no queijo mussarela, embora a amplificação tenha sido moderada. Não houve detecção da SED nos queijos cotage e mussarela artificialmente contaminados ou da SEA no queijo cotage.

O resultado negativo da Multiplex PCR na detecção direta de alimentos pode ser devido a matriz alimentar, neste caso, o queijo minas frescal. A matriz alimentar pode reduzir a sensibilidade da PCR. O conteúdo de gordura é relatado como um dos maiores fatores que reduzem a sensibilidade da PCR, e a baixa sensibilidade dos testes que analisam os queijos tem sido atribuída a composição deste tipo de alimento por Wilson *et al.* (1997) e McLauchlin *et al.* (2000). Todavia, Tamarapu *et al.* (2001) não observaram diferenças na detecção de *S. aureus* entre as matrizes alimentares, visto que o mesmo nível de sensibilidade foi obtido nos homogenatos de leite desnatado e queijo tipo cheddar. O fator determinante no trabalho destes autores foi a diluição das amostras de queijo. Neste trabalho, também foram realizadas diluições e mesmo assim não foram obtidos resultados positivos.

Estes dados mostraram que para o queijo minas frescal seria necessário primeiramente a realização do isolamento de colônias de estafilococos coagulase-positiva. Sendo assim, neste trabalho isolamos 231 colônias que foram submetidas a coloração de Gram, ao teste da catalase e ao teste da coagulase. Destas foram selecionadas 111 colônias de estafilococos coagulase-positiva (104) e coagulase-negativa (7) que foram submetidas ao teste de multiplex PCR. Trinta e quatro colônias (30,62%) foram positivas para algum dos

cinco genes de enterotoxinas pesquisados: 15 (13,51%) foram positivas para *femA*, *sea* e *seb*, 5 (4,5%) foram positivas para *sea*, 9 (8,11%) foram positivas para *sea* e *seb*, 2 (1,8%) foram positivas para *sed* e 3 (2,7%) foram positivas para *femA* e *sed*. Trinta e nove (35,14%) amplificaram somente o gene *femA* e nenhum gene de enterotoxinas (Figura 3), e 38 (34,24%) foram negativas para todos os genes.

Estes resultados estão de acordo com McLauchlin *et al.* (2000) e com Nájera-Sánchez *et al.* (2003). McLauchlin *et al.* (2000) analisaram 129 culturas de *S. aureus*, 39 das quais foram retomadas de 38 incidentes de intoxicação alimentar estafilocócica. Os resultados da PCR para detecção dos genes de enterotoxinas nas 129 cepas foram: SEA (12), SEA + SEB (2), SEA + SED (4) entre outros. Das cepas suspeitas de envolvimento em intoxicação alimentar, 9, 4 e 2 foram devido a SEA, SEB e SEC (sozinhas ou associadas com outra enterotoxina), respectivamente. Os resultados de Nájera-Sánchez *et al.* (2003) mostraram que das cepas isoladas de carne (lingüiça, presunto e chouriço) e produtos laticínios (leite em pó e queijo) pela técnica de Baird-Parker, 51 continham os genes das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e SEE, sendo os tipos mais frequentes SEA (64%), SEC (40%), SED (68%), SEA + SEB (14%).

Entre os sete estafilococos coagulase-negativa analisados pela Reação Multiplex PCR, quatro foram negativos, um foi positivo para *femA* e *sed* e dois foram positivos somente para *sed*. Estes resultados estão em desacordo com os achados de Blaiotta *et al.* (2004) que concluíram que a ocorrência de genes de enterotoxinas em estafilococos coagulase-negativa e de outras espécies estafilocócicas não-*S. aureus* isolados de salame, leite de búfalo cru e queijo mussarela é rara.

Com relação à detecção somente do gene *femA*, 57 (51%) das 111 colônias analisadas amplificaram este gene. O fato de 49% não amplificarem *femA* pode indicar que estas 54 colônias não são de *S. aureus*, visto que os primers deste gene utilizados em nosso trabalho são específicos para *S. aureus*.

## 7 Conclusão

---

Os resultados deste trabalho revelaram que dos 30 queijos minas frescal analisados, 40% estão em desacordo com o padrão legal vigente.

Com relação à detecção dos genes das cinco enterotoxinas (A, B, C, D, E), estes resultados revelaram que para a detecção em queijos minas frescal é necessário um prévio isolamento das colônias estafilocócicas pela técnica convencional. Sendo assim, a Multiplex PCR se revelou complementar fornecendo informações precisas quanto à presença de *S. aureus* com potencial risco de causar intoxicação alimentar e dos genes que codificam as enterotoxinas SEA, SEA +SEB e SED.

Considerando o baixo custo e o menor tempo necessário para detectar os seis genes de *S. aureus* pela multiplex PCR, concluiu-se que esta é uma ferramenta poderosa no estudo de genótipos de isolados estafilocócicos e que certamente poderia ser incorporada às rotinas de pesquisa do Instituto nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS.

## Referências Bibliográficas

---

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3. ed. Washington, D.C: APHA Press. 1992.

ABE, J.; ITO, Y.; ONIMARU, M.; KOHSAKA, T.; TAKEDA, T. Characterization and distribution of a new enterotoxin-related superantigen produced by *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Immunology**, v. 44, p. 79-88, 2000.

ADAK, G.K.; LONG, S.M.; O'BRIEN, S.J. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. **Gut**, v. 51, p. 832-841, 2002.

AKINEDEN, Ö.; ANNEMÜLLER, C.; HASSAN, A.A.; LÄMMLER, C.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 5, p. 959-964, set. 2001.

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

ALMEIDA, P.M.P; FRANCO, R.M. Avaliação Bacteriológica de Queijo tipo Minas Frescal com Pesquisa de patógenos importantes à Saúde Pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp e coliformes fecais. **Higiene Alimentar**, v.17, n.111, p.79-85, 2003.

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

ATANOSSAVA, V.; MEINDL, A.; RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham – a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 105-113, 2001.

ATLAS, R.M.; BEJ, A. K. Polymerase Chain Reaction. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R. (eds). **Methods for General and Molecular Bacteriology**. American Society for Microbiology, 1994. cap.19, p. 418-435.

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

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

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Analytical chromatography for recovery of samll amounts of staphylococcal enterotoxins from food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 33-40, 2001.

BAYLES, K.W.; IANDOLO, J.J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **Journal Bacteriology**, v.171, p.4799-4806, 1989.

BECKER, K.; FRIEDRICH, A.W.; LUBRITZ, G.; WEILERT, M.; PETERS, G.; EIFF, C. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1434-1439, 2003.

BECKER, K.; KELLER, B.; VON EIFF, C.; BRUCK, M.; LUBRITZ, G.; ETIENNE, J.; PETERS, G. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5551-5557, 2001.

BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxingenes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. **Journal Clinical Microbiology**, v.36, p.2548-2553, 1998.

BENNET, R.W. The biomolecular temperaments os staphylococcal enterotoxin in thermally processed fods. **Journal Association Official Analytical Chemistry International**, v. 75, p. 6-12, 1992.

BENSON, T.E.; PRINCE, D.B.; MUTCHLER, V.T.; CURRY, K.A.; HO, A.M.; SARVER, R.W.; HAGADORN, J.C.; CHOI, G.H.; GARLICK, R.L. X-Ray Crystal Structure of *Staphylococcus aureus* femA. **Structure**, v. 10, p. 1107-1115, 2002.

BERGDOLL, M.S. Enterotoxins. In: EASMAN. C.S.F.; ADLAM,C. (eds). **Staphylococci and Staphylococcal Infections**. London: Academic Press, 1983. p. 559-598.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P. (ed). **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York. Marcel Dekker Inc, 1989. p.463-523.

BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning. In: RIEMMAN, H.; BRYAN, F.L (eds). **Foodborne infections and intoxications**. New York: Academic Press, 1990. p. 85-106.

BERGER-BACHI, B.; BARBERIS-MAINO, L.; STRASSIE, A.; KAYSER, F.H. FemA, a host-mediated factor essencial for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. **Molecular Gene Genetic**, v. 219, p. 263-269, 1989.

BETLEY, M.J.; MEKALANOS, J.J. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. **Science**, v. 229, p. 185-187, 1985.

BETLEY, M.J.; MEKALANOS, J.J. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 34-41, 1988.

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

BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C<sub>1</sub> gene and relatedness to other pyrogenic toxins. **Molecular Gene Genetic**, v. 209, p. 15-20, 1987.

BORST, D.W.; BETLEY, M.J. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression correlate with sea allele class. **Infection Immunology**, v. 62, p. 113-118, 1994.

BRAKSTAD, O.G.; AASBAKK, K.; MAELAND, J.A. Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the *nuc* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 1654-1660, jul. 1992.

BRAMLEY, A.J.; MCKINNON, C.H. **Dairy microbiology: the microbiology of milk**. 2 ed. London/New York: Elsevier Science Ltda, p.163-207. 1990.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, dez. 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Dispõe o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, set. 1997.

CARDOSO, H.F.; SILVA, N.; SENA, M.J.; CARMO, L.S. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Letters Applied Microbiology**, v. 29, p. 347-349, 1999.

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

CHAMBERLAIN, J.S.; CHAMBERLAIN, J.R. Optimisation of multiplex PCRs. In: MULLIS, K.B.; FERREE, F.; GIBBS, R.A. (eds). **The Polymerase Chain Reaction**. Boston: Birkhauser, 1994. p. 38-46.

CORBIA, A. C.G.; NASCIMENTO, M.G.F.; OLIVEIRA, C.Z.F.; NASCIMENTO, E.R. *Staphylococcus aureus*: Importância para a Saúde Pública e Aspectos Epidemiológicos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000, 15 p. Embrapa CNPAB. Documentos, 114. ISSN 0104-6187.

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

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

DE LUCA, G.; ZANETTI, F.; STAMPI, S. *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 267-270, 1997.

DODD, C.E.R.; SHARMA, N.K.; REES, C.E.D. Development of a Single-Reaction Multiplex PCR Toxin Typing Assay for *Staphylococcus* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1347-1353, 2000.

ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; COPPOLA, S. PCR-based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1090-1096, 2004.

ERLICH, H.A. **PCR: technology: principles and applications for DNA amplification**. New York/Oxford: Oxford University Press. 1992.

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**, v.7, p. 311-316, 1988.

FENG, P. Development and Impact of Rapid Methods for Detection of Foodborne Pathogens. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAL, L.R.; MONTEVILLE, T.J. (eds), **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. 2<sup>nd</sup> ed. Washigton DC: ASM Press, 2001. cap 38, p. 775-796.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Manual da Qualidade - POP no 65.3210.032. 2003. 16 p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical Manual *Online*. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>. Acesso em: 10 out. 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bad Bug Book. *Staphylococcus aureus*. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>. Acesso em: 01 mai. 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Food Microbiological Control**. Washington, D.C.: Division of Human Resource Development Branch. 1998. 796p.

FRANCO, B.D.G.M. Critérios Microbiológicos para Avaliação da Qualidade de Alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. cap. 8, p. 149-154.

FRANCO, B.D.G.M. Métodos de Análise. In: FRANCO, B.D.G.M & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004a. cap. 10, p. 165-176.

FRANCO, B.D.G.M, LANDGRAF, M. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. cap. 4, p. 33-81.

FREITAS, A.C.; NUNES, M.P.; MILHOMEM, A.M.; RICCIARDI, I.D. Occurrence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro, Brasil. **Journal of Food Protection**, v. 5, p. 62-65, 1993.

FUEYO, J.M.; MARTÍN, M.C.; GONZÁLEZ-HEVIA, M.A.; MENDOZA, M.C. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 139-145, 2001.

FURTADO, M. M. **A Arte e a Ciência do Queijo**. 2ed. São Paulo: Globo. 1991.

GENIGEORGIS, C.A. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. **International Journal of Food Microbiology**, v. 9, p. 327-360, 1989.

GONZALES-FANDOS, M.E.; SIERRA, M.; GARCIA-LOPEZ, M.L. GARCIA-FERNANDEZ, M.C.; OTERO, A. The influence of manufacturing and dry conditions on the survival and toxinogenesis of *Staphylococcus aureus* in two Spanish dry sausages (chorizo and salchichon). **Meat Science**, v. 52, p. 411-419, 1999.

HAN, B.; SESENNA, B.; BEUMER, R.R.; NOUT, M.J.R. Behaviour of *Staphylococcus aureus* during sufu production at laboratory scale. **Food Control**, n. 16, p. 243-247, 2005.

HENEGARIU, O; HEEREMA, N.A.; DLOUHY, S.R.; VANCE, G.H.; VOGT, P.H. Multiplex PCR: Critical Parameters and step-by-step protocol. **Bio Techniques**, v. 23, p. 504-511, 1997.

HIROOKA, E.Y.; MULLER, E.; FREITAS, J.C.; VINCENTE, E.; YOSHIMOTO, Y.; BERGDOLL, M.S. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, p. 185-191, 1988.

HOLECKOVA, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M.; KALINACOVA, V.; GONDOL, J.; GROLMUS, J. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Ann. Agriculture Environmental Medical**, v.9, p. 179-182, 2002.

ISEPON, J.S.; SANTOS, P.A.; SILVA, M.A.P. Avaliação Microbiológica de Queijos Minas Frescal comercializados na cidade de Ilha Solteira – SP. **Higiene Alimentar**, v.17, n.106, p.89-94, 2003.

JABLONSKI, J.M.; BOHACH, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAL, L.R.; MONTEVILLE, T.J. (eds). **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washigton DC: ASM Press, 2001. cap. 19, p. 411-434.

JARRAUD, S.; COZON, G.; VANDENESCH, F.; BES, M.; ETIENNE, J.; LINA, G. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2446-2449, 1999.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M.A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESH, F. egc, a highly prevalent operon of enterotoxins gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 669-677, 2001.

JAULHAC, B.; BES, M.; BORNSTEIN, N.; PIEMONT, Y.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Synthetic DNA probes for detection of genes for enterotoxins A, B, C, D, E and TSST-1 in staphylococcal strains. **Journal of Applied Microbiology**, v.72, p. 386-392, 1992.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L. & ADELBERG, E. A. Os Estafilococos. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia Médica**. 20<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 14, p. 146-150.

JOHNSON, S.; KRÜGER, D.; LABISCHINSKI, H. FemA of *Staphylococcus aureus*: Isolation and immunodetection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 132, p. 221-228, 1995.

JONES, C.L.; KHAN, S.A. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 166, p. 29-33, 1986.

KAPLEY, A.; LAMPEL, K.; PUROHIT, H.J. Thermocycling steps and optimization of multiplex PCR. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1913-1918, 2000.

KHAMBATY, F.M.; BENNET, M.R.W.; SHAH, D.B. Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. **Epidemiology Infection**, v. 11, p. 75-81, 1994.

KITAI, S.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; SATO, E.; NAKANO, C.; KITAGAWA, H.; FUJIO, K.; MATSUMURA, K.; YASUDA, R.; INAMOTO, T. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* and Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Retail Raw Chicken Meat Throughout Japan. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 3, p. 269-274, 2005.

KIZAKI, M.; KOBAYASHI, Y.; IKEDA, Y. Rapid and sensitive detection of the *femA* gene in staphylococci by enzymatic detection of polymerase chain reaction (ED-PCR): comparison with standard PCR analysis. **Journal of Hospital Infection**, v. 28, p. 287-295, 1994.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr, W.C. Cocos Gram-Positivos – Parte I: Estafilococos e Microrganismos Relacionados. In: \_\_\_\_\_. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. cap. 11, p. 551-581.

KUCHTA, T.; PIKNOVÁ, L. STEFANOVICOVÁ, A.; DRAHOVSKÁ, H.; SASIK, M. Detection of *Salmonella* in food, equivalent to ISO 6579, by a three-days polymerase chain reaction-based method. **Food Control**, v. 13, p. 191-194, 2002.

KUCHTA, T. KACLÍKOVÁ, E.; PANGALLO, D.; DRAHOVSKÁ, H.; ORAVCOVÁ, K. Detection of *Listeria monocytogenes* in food, equivalent to EN ISO 11290-1 or ISO 10560, by a three-days polymerase chain reaction-based method. **Food Control**, v.14, p. 175-179, 2003.

KURODA, M. e outros 36 autores. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v 357, p. 1225-1240, 2001.

LANCETTE, G.A.; TATINI, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3. ed. Washington, D.C: APHA Press. 1992. cap. 33, p. 533-550.

LANTZ, P.; HAHN-HÄGERDAL, B.; RADSTRÖM, P. Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. **Trends in Food Science & Technology**, v. 5, p. 384-389, 1994.

LARSEN, H.D.; HUDA, A.; ERIKSEN, N.H.R.; JENSEN, N.E. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. **Veterinary Microbiology**, v. 76, p. 153-162, 2000.

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

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

LIVERMORE, D.M. Antibiotic Resistance in staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. S3-S10, 2000.

LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1-8, 2001.

LUPIEN, J.R.; KENNY, M.F. Tolerance limits and methodology: effect on international trade. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1571-1578, 1998.

MAIDHOF, H.; REINICKE, B.; BLÜMEL, P.; BERGER-BÄCHI, B.; LABISCHINSKI, H. FemA, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant

and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 3507-3513, 1991.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RADSTRÖM, P.; COOK,.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p.39-48, 2003.

MARR, J.C.; LYON, J.D.; ROBERSON, J.R.; LUPHER, M.; DAVIS, W.C.; BOHACH, G.A. Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. **Infection Immunology**, v. 61, p. 4254-4262, 1993.

MARTINS, L.T. *Staphylococcus*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N (eds). **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. cap. 18, p. 149-156.

McLAUHLIN, J.; NARAYANAN, G.L.; MITHANI, V.; O'NEILL, G. The detection of enterotoxins and Toxic Shock Syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 4, p. 479-488, 2000.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. 607-625, sept/oct. 1999.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W.M. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, 2000.

MEYRAND, A.; BOUTRAND-LOEIL, S.; RAY-GUENIOT, S.; MAZUY, A.; GASPARD, C.E. JAUBERT, G.; PERRIN, G.; LAPEYRE, C.; VERNOZY-ROZARD, C. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goat's milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 537-544, 1998.

MONDAY, S.R.; BONACH, G.A. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. **Journal Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3411-3414, 1999.

MULLIGAN, M.E.; MURRAY-LEISURE, K.A.; STANDIFORD, H.C.; JOHN, J.F.; KAUFFMAN, C.A.; YU, V.L. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Consensus Review of the Microbiology, Pathogenesis, and Epidemiology With Implications for Prevention and Management. **The American Journal of Medicine**, v. 94, p. 313- 328, 1993.

NÁJERA-SÁNCHEZ, G.; MALDONADO-RODRÍGUEZ, R.; VERA, P.R., DE LA GARZA, L.M. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 6, p. 1055-1062, 2003.

NASCIMENTO, M.G.F.N.; CORBIA, A. C.G.; NASCIMENTO, E.R. Limitações da Técnica de Isolamento e Enumeração de *Staphylococcus aureus*. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, dez. 2001. 4 p. Embrapa CTAA. **Comunicado Técnico**, 45. ISSN 0103-5231.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIYU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A.P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N.C.; CELANO, G.V. Coagulase-positive staphylococci and *staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 73-79, 2005.

OLIVEIRA, J.S. **Queijo: Fundamentos Tecnológicos**. 2 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1986.

OMOE, K.; ISHIKAMA, M.; SHIMODA, Y.; HU, D.L.; UEDA, S.; SHINAGAWA, K. Detection of *seg*, *she* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and

determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolate harbouring *seg*, *she* and *sei* genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p. 857-862, 2002.

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

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

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

PEACOCK, S.J.; MOORE, C.E.; JUSTICE, A; KANTZANOU, M.; STORY, L.; MACKIE, K.; O'NEILL, G.; DAY, N.P.J. Virulente Combinations of Adhesin and Toxin Genes in Natural Populations of *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4987-4996, 2002.

PEREIRA, M.L; LARA, M.A.; DIAS, R.S.; CARMO, L.S. Staphylococcal food poisoning by cheese 'tipo minas'. **Revista de Microbiologia**, v. 22, p. 349-350, 1991.

PERESI, J.T.M. Queijo Minas tipo Frescal Artesanal e Industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v.15, n.83, p.63-70, 2001.

PIERSON, M.D.; CORLETT, D.A (ed). **HACCP: Principles and Applications**. New York/London: Chapman & Hall, 1992. 212p.

PIERSON, M.D.; SMOOT, L.M. Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. . In: DOYLE, M. P.; BEUCHAL, L.R.; MONTEVILLE, T.J. (eds), **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. 2<sup>nd</sup> ed. Washigton DC: ASM Press, 2001. cap 4, p. 71-87.

RANDELL, A.W.; WHITEHEAD, A.J. Codex Alimentarius: food quality and safety standards for international trade. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 16, p. 313-321, 1997.

RASOOLY, A.; RASOOLY, R.S. Detection and analysis of staphylococcal enterotoxin A in food by western immunoblotting. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 205-212, 1998.

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia Prática: Roteiro e Manual – Bactérias e Fungos**. São Paulo: Livraria Atheneu Editora. 2002. p. 5-6.

RIJPENS, N.P.; HERMAN, L.M.F. Molecular Methods for Identification and Detection of Bacterial Food Pathogens. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 4, p. 984-995, 2002.

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

RODRIGUEZ, L.; SOLIN, A.L.; DIAZ, M.; BREGDOLL, M.S. Selective enterotoxin production in foods by *Staphylococcus aureus* strains that produce more than one enterotoxin. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 538-540, 1993.

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

ROSEC, J.P.; GUIRAUD, J.P.; DALET, C.; RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 213-221, 1997.

SABIONI, J.G.; HIROOKA, E.Y.; SOUZA, M.L. Food poisoning by Minas-type cheese contaminated with *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde pública**, v. 22, p. 458-461, 1988.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3 rd. vol. 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. Apêndice A.1.7 – A 1.24.

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**, v. 10, p. 33-42, 1990.

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

SLAVIK, M.F.; WANG, R. –F.; CAO, W. –W. Development and evaluation of PCR method for diagnosis of *Mycoplasma galisepticum* infection in chicken. **Molecular and Cellular Probes**, v. 7, p. 459-463, 1993.

SORIANO, J.M.; FONT, G.; MOLTÓ, C.; MAÑES, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 60-67, 2002.

SOUZA, T. C. **Alimentos: propriedades físico-químicas**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2001.

TAMARAPU, S.; MCKILLIP, J.L.; DRAKE, M. Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in Dairy Products. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 5, p. 664-668, 2001.

TAUXE, R.V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 78, p. 31-41, 2002.

THE INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in Foods 2: Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications**. Canada: University of Toronto Press, 2<sup>nd</sup> edition, 1986. 2v. 293 p.

TONG-RONG, C.; MING-HAUNG, H.; CHIEN-SHUN, C.; HAU-YANG, T. Development and use of primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foodborne outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 17, p. 63-70, 2001.

TOSHKOVA, K.; ANNEMÜLLER, C.; AKINEDEN, Ö.; LÄMMLER, CH. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as risk factor for human skin infections. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, p. 17-24, 2001.

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

UN LEE, S.; QUESNELL, M.; FOX, L.K.; WON YOON, J.; HO PARK, Y.; DAVIS, W.C.; FALK, D.; DEOBALD, C.F.; BOHACH, G.A. Characterization of staphylococcal bovine mastitis isolates using the polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1384-1386, 1998.

VANNUFFEL, P.; HEUSTERSPREUTE, M.; BOUYER, M.; VANDERCAM, B.; PHILIPPE, M.; GALA, J. Molecular characterization of *femA* from *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and *femA*-based discrimination of staphylococcal species. **Revista Microbiologia**, v. 150, p. 129-141, 1999.

VAUTOR, E.; ABADIE, G.; GUIBERT, J.-M.; HUARD, C.; PÉPIN, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, v. 96, p. 69-79, 2003.

VAUTOR, E.; ABADIE, G.; GUIBERT, J.-M.; CHEVALIER, N.; PÉPIN, M. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in dairy sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 235-239, 2005.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PERRIN, G.; HAOND, F.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Identification of *Micrococcaceae* isolated from goat's milk and cheese in the Poitou-Charentes region. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 373-378, 1996.

WANG, R. -F.; BEASLEY, J.N.; CAO, W. -W.; SLAVIK, M.F.; JOHNSON, M.G. Development of PCR method specific for Marek's disease virus. **Molecular and Cellular Probes**, v. 7, p. 127-131, 1993b.

WANG, R. -F.; CAMPBELL, W.; CAO, W. -W.; WARD, C.; STEELE, R.S.; CERNIGLIA, C.E. Detection of *Pasteurella pneumotropica* in laboratory mice and rats by PCR. **Laboratory Animal Science**, v. 46, p. 81-85, 1996c.

WANG, R. - F.; CAO, W. -W.; CAMPBELL, W.L.; HAIRSTON, I.; FRANKLIN, W.; CERNIGLIA, C.E. The use of PCR to monitor the population abundance of six human intestinal bacterial species in an *in vitro* semicontinuous culture system. **FEMS Microbiology Letters**, v. 124, p. 229-238, 1994b.

WANG, R. -F.; CAO, W. -W.; CERNIGLIA, C.E. PCR detection and quantitation of predominate anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p. 1242-1247, 1996a.

WANG, R. -F.; CAO, W. -W.; CERNIGLIA, C.E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 727-736, 1997.

WANG, R. -F.; CAO, W. -W.; FRANKLIN, W.; CAMPBELL, W.L.; CERNIGLIA, C.E. A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food. **Molecular and Cellular Probes**, v.8, p. 131-138, 1994a.

WANG, R. -F.; CAO, W. -W.; JOHNSON, M.G. Development of a 16S rRNA-based oligomer probe specific for *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 3666-3670, 1991.

WANG, R. -F.; CAO, W. -W.; JOHNSON, M.G. 16S rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2827-2831, 1992a.

WANG, R. -F.; CAO, W. -W.; WANG, H.; JOHNSON, M.G. A16S rRNA-based DNA probe and PCR method specific for *Listeria ivanovii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 106, p.85-92, 1993a.

WANG, R. -F.; LUNEAU, A.; CAO, W. -W.; CERNIGLIA, C.E. PCR detection of polycyclic aromatic hydrocarbons degrading Mycobacteria in soil. **Environmental Science and Technology**, v. 30, p. 307-311, 1996b.

WANG, R. -F.; SLAVIK, M.F.; CAO, W. -W. Arapid PCR method for direct detection of low numbers of *Campylobacter jejuni*. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 1, p. 101-108, 1992b.

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3741- 3751, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food Safety and Foodborne Illness. Disponível em: <http://www.who.int/inf-fs/en/fact237.html>. Acesso em: 29 de set. 2003a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food Safety and Foodborne Illness. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/micro/riskassessment/en>. Acesso em: 29 de set. 2003b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO global strategy for food safety: safer food for better health. (Food safety issues), 2002.

## 8 Anexo

---

### Meios de Cultura

#### 1. Ágar Baird-Parker

##### 1.1. Meio Base

Composição:

Triptona	10,0 g
Extrato de carne	5,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
Piruvato de sódio	10,0 g
Glicina	12,0 g
Cloreto de lítio (6 H <sub>2</sub> O)	5,0 g
Ágar-ágar	20,0 g
Água destilada	1000 mL

pH 6,8 - 7,2 , 121°C/ 15 min.

Preparação: misturar os ingredientes em 940 ml de água destilada. Autoclavar a 121°C/ 15 minutos. Esfriar a 55°C e adicionar emulsão de ovo e telurito de potássio. Misturar 50 ml da emulsão de gema de ovo com 10 ml de solução de telurito de potássio a 3,5%.

##### 1.2. Solução de telurito de potássio a 3,5%

Composição:

Telurito de potássio	3,5 g
Água destilada	1000 mL

Preparação: dissolver o telurito de potássio e esterilizar por filtração.

##### 1.3. Emulsão de gema de ovo a 50%

Selecionar uma quantidade de ovos necessária ao preparo do meio. Lavar a superfície de cada ovo com água e sabão com o cuidado de mantê-los intactos. Deixar os ovos imersos em álcool a 70% durante 10 minutos. Quebrar a superfície do ovo formando um orifício na região da câmara de ar, desprezar a clara e transferir, assepticamente, a gema para recipiente estéril. Adicionar igual volume de solução salina estéril a 0,85%. Estocar a suspensão a 5°C.

## 2. Caldo Nutriente

Composição:

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Água destilada	1000 mL

pH 7,3 , 121°C/ 15 min.

Preparação: dissolver os ingredientes, em banho-maria, fervendo, sob agitação freqüente, acertar o pH, distribuir em tubos de ensaio, esterilizar à 121°C/ 15 minutos.

## 3. Ágar Nutriente

Composição:

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Ágar ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

pH 7,3 , 121°C/ 15 min.

Preparação: dissolver os ingredientes, em banho-maria, fervendo, sob agitação freqüente, acertar o pH, distribuir em tubos de ensaio, esterilizar a 121°C/ 15 minutos. Inclinando após autoclavar, antes que o meio esfrie.

## 4. Caldo Infusão de Cérebro-Coração (BHI)

Composição:

Infusão de cérebro de bezerro	12,5 g
Infusão de coração de boi	5,0 g
Proteose peptona	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato monoácido de sódio	2, 5 g
Glicose	2,0 g
Água destilada	1000 mL

Preparação: suspender os componentes em água destilada e dissolver por aquecimento até ebulição. Distribuir volumes de 3 mL em tubos de 13x100 mm. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

## 5. Ágar Infusão de Cérebro-Coração (BHI)

Composição:

Infusão de cérebro de bezerro	12,5 g
Infusão de coração de boi	5,0 g
Proteose peptona	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato monoácido de sódio	2, 5 g
Glicose	2,0 g
Agar-ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

Preparação: suspender os componentes em água destilada e dissolver por aquecimento até ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Distribuir volumes de 20 mL em placas de Petri.

## 6. Caldo TSBYE

Composição:

Meio TSB (Caldo Casoy)	30 g
Extrato de levedura	6 g
Água destilada	1000 mL

Preparação: suspender os componentes em água destilada, dissolver e distribuir. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Reagentes

## 7. Tampão fosfato de Butterfield

7.1. Composição Solução estoque:

Fosfato de potássio monobásico	34 g
Água destilada	500 mL

Preparação: suspender os componentes em água destilada. Ajustar o pH para 7,2 com solução de hidróxido de sódio 1N. Completar o volume para 1000 mL com água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Manter a solução estoque em temperatura de refrigeração.

7.2. Preparo do tampão

Medir 1,25 mL da solução estoque e acrescentar água destilada para um volume final de 1000 mL Distribuir volumes de 90 mL em garrafas de diluição ou erlenmeyers de 250 mL

e volumes de 225 mL em erlenmeyers de 500 mL. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

#### 8. Solução Salina a 0,85%

Composição:

Cloreto de sódio	8,5 g
Água destilada	1000 mL

Preparação: suspender o componente em água destilada. Distribuir e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

#### 9. Peróxido de Hidrogênio a 3%

Composição:

Peróxido de hidrogênio a 30%	1,0 mL
Água destilada	10 mL

Preparação: homogeneizar e estocar a temperatura de refrigeração.

#### 10. Salina tampão fosfato (*Phosphate-buffered Saline* - PBS)

Composição:

Cloreto de sódio	8,0 g
Cloreto de potássio	0,2 g
Fosfato de sódio bibásico	1,44 g
Fosfato de potássio monobásico	0,24 g
Água destilada	1000 mL

Preparação: suspender os componentes em água destilada. Ajustar o pH para 7,4 com solução de ácido clorídrico. Completar o volume para 1000 mL com água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

#### 11. Solução de Triton X-100 a 1%

Composição da solução estoque a 10%:

Triton X-100	10,0 mL
Água destilada	1000 mL

Preparação: suspender o componente em água destilada. Dissolver e diluir 10 vezes. Distribuir e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.