

T637
5474p
2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO, RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E AOS
CONSERVANTES NISINA E SISTEMA LACTOPEROXIDASE DE
Staphylococcus sp ISOLADOS DE QUEIJOS COALHO
COMERCIALIZADOS EM RECIFE - PE

MARIA JOSÉ DE SENA

U.F.M.G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



14250005

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

OK
02/03/04/06

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2000

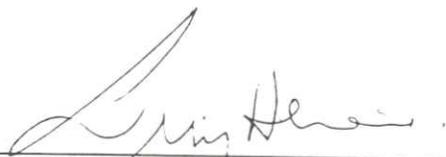
Tese defendida e aprovada em 21 de janeiro de 2000, pela Comissão Examinadora constituída por:



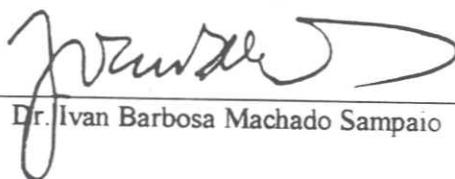
Dra. Maria Beatriz Abreu Glória
(Orientadora)



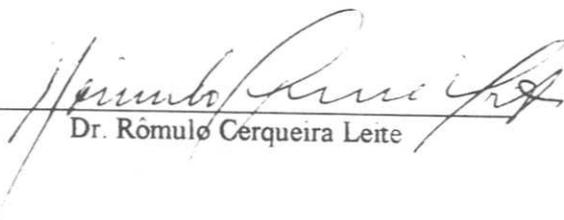
Dra. Célia Lúcia de Luces F. Ferreira



Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine



Dr. Ivan Barbosa Machado Sampaio



Dr. Rômulo Cerqueira Leite

À Deus pelo dom da vida e aos meus pais José Martins e Brasilina Maria pelo apoio, incentivo, dedicação e amor que sempre demonstraram por nós.

Aos Mestres e amigos queridos Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira, Marcelo Resende de Souza, Cláudia Freire de Andrade Morais Penna, pelos ensinamentos, carinho e amizade demonstrados durante nosso convívio.

O verdadeiro Mestre é aquele que educa com o seu próprio exemplo

Ao Mestre Luiz Simeão do Carmo, pelos ensinamentos, dedicação e amizade demonstrados durante o desenvolvimento deste trabalho.

In memoriam:

Ao Mestre Edson Clemente dos Santos (DTIPOA/EV/UFMG) pelo incentivo e apoio quando da minha permanência aqui no ano de 1990 e ao Mestre Merlin Bergdoll (Food Research Institute/Wisconsin/EUA) pela orientação à distância e colaboração neste trabalho.

Aos amigos Marcelo Resende de Souza, Régia Paula Vilaça, Tânia Resende Garcia, Sibelli Passini, Gabriela Farias, Cláudia Freire de Andrade Morais Penna, Patrícia Vilhena e Deise Aparecida dos Santos, pela colaboração e empenho na fase de elaboração dos queijos.

AGRADECIMENTOS

À Professora Maria Beatriz Abreu Glória, pela orientação e confiança no meu trabalho.

Ao Amigo querido Valdemiro Júnior pela amizade fraterna, companheirismo e convívio harmonioso durante esses quatro anos.

À minha família pelo apoio, incentivo, por terem demonstrado durante esses quatro anos que nunca estiveram ausente em minha vida e pela demonstração de amor a cada telefonema dado.

As amigas queridas Margarida Stührenberg, Enedina Benevides, Francisca Rodrigues e Luciane Lima pelo suporte, incentivo, carinho e apoio.

Ao Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial:

Ao Prof. Rinaldo Aparecido Mota, Sineide Maria de Oliveira Vilela, Eva Laurice Pereira Cunha e Ana Paula Ferreira Santos pelo envio das amostras, parte fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Às Professoras Márcia Brayner e Ivone Holanda pela presteza e amizade.

À Professora Eurides Alves de Souza Coordenadora de Assuntos Internacionais e Programas Especiais da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRPE, pelo profissionalismo e amizade.

Ao Professor Severino Benone Paes Barbosa Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRPE, pelo incentivo e empenho demonstrados.

À Escola de Veterinária da UFMG, em especial:

Aos amigos do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, em especial aos Professores. Wagner Moreira, Mônica Leite, Renaldo Travassos, Ronaldo Pimenta, Ronon Rodrigues, Rogério Marcos de Souza, Leorges Moraes, José Ferreira e Afonso Liguori pela acolhida e carinho que sempre demonstraram para comigo, durante esses quatro anos.

Aos amigos da Pós-graduação: Cláudia Azevedo, Maurício Silveira, Daniel Pereira, Ana Carolina, Maria Isabel, Lourdes Aparecida, Karyne Mourthé, Marcos Dias, André Lima, Sinfrônio Soares, Cláudia Antunes, Alessandro Carcabulho e Ivana Siqueira pelo carinho e amizade demonstrados durante nosso convívio.

Ao Secretário Milton Luiz de Jesus pela presteza e amizade.

Aos técnicos Maura Regina, Renato Porto e Murilo Queiroz pela amizade

Ao Departamento de Serviços Gerais, em especial ao Sr. Eustáquio Luiz, Sr. Orlando Alves aos amigos Roberto Eustáquio, Antônio Carlos, Sebastião Joventino, Sebastião Pires, Edson Elias, Valdo Angelino e Elias Estevan, pela presteza e por estarem sempre solícitos em todos os momentos que precisei dos seus serviços.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva em especial aos Professores Romário Cerqueira Leite, Rômulo Cerqueira Leite, Elvivo Moreira, aos colegas da Pós-Graduação em especial a Cristiano Barros Melo, Christina Muratori, Ricardo Miranda, Heleno Cardoso, Isabel Cristine, Paula Aryane e aos funcionários Valter Lúcio, Luciana Batista Antunes, Renata Martins, Jorge Carlos, Sônia Rita Nascimento e Nádia Maria da Silva pela presteza, carinho e amizade.

Ao Coordenador do Colegiado de Pós-graduação Prof. Rômulo Cerqueira Leite e as Secretárias Nilda Lucas Laurindo, Ana Raquel Samento, Eliana Silva e Fátima Regina, pela presteza, carinho e amizade.

Ao Prof. Ivan Sampaio pela orientação no delineamento estatístico deste trabalho e pela amizade.

As Bibliotecárias e funcionários da Biblioteca da E.V Ana Lúcia Anchieta, Rosilene Almeida, Walkíria Oliveira, Ivonete Lima, Leila Gusmão, Márcio Luiz Prado, Eliana Viana, Marlene Moreira, Renata Lopes e Rosilney Vasconcelos, pela presteza, profissionalismo e amizade.

Aos funcionários da copiadora Bréder em especial a Silene Bréder, Elder Castilho Cleyton Carlos, Anderson Carlos, Denise Francisco, Vânia e Marize Helena pela amizade e presteza com que sempre nos atendeu.

Aos amigos nordestinos estudantes de Pós-Graduação pelo caloroso convívio e aos demais amigos da Escola de Veterinária.

À Fundação Ezequiel Dias, em especial:

Ao Dr. Nery Cunha Vital e Dra. Elizabeth Catalan Pereira, por terem autorizado o uso das instalações dos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Enterotoxinas Estafilocócicas para a realização deste trabalho.

Aos amigos pesquisadores, técnicos, estagiários e bolsistas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos em especial a Maria Crisolita Cabral, Ricardo Souza Dias, Susane Oliveira, Josélia Souza, Sandra Fernandes, Maria Lúcia Pereira, Berenice Martins, Eunice Carvalho, Maíra Lopes, Luciana Dalva, Francisco Pereira, Talita Cristina, Fernanda Paula e Michele Farias pelos ensinamentos e amizade.

Ao Laboratório de Enterotoxinas Estapilocócicas em especial ao Mestre e amigo Luiz Simeão do Carmo, pelos valiosos ensinamentos e amizade. Às biólogas Juliana Moreira da Silva, Deise Aparecida dos Santos e Leoneide Érica Maduro Bouillet pela colaboração e presença fiel e amiga em todas as etapas desse trabalho

À Divisão de Pesquisa em especial ao Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine, Maria Raquel Araújo, Álvaro Dultra, Adriana Cássia, Siléia Silva e Dário José de Sousa pelos ensinamentos e amizade.

Ao Laboratório de Micologia e Micotoxinas em especial aos Pesquisadores Guilherme Prado, Vanessa Drumond, Jovita Gazzinelli e Marize Oliveira pelo carinho e convívio amigo.

Ao Laboratório de Química Bromatológica em especial ao pesquisador Kleber Baptista pela presteza e amizade.

A Divisão de Biologia Médica em especial ao Pesquisador Geraldo Leocádio Filho pelos ensinamentos e amizade.

À Secretária do setor de Bromatologia e Toxicologia Marina Lúcia Gomes, pela presteza e amizade.

Ao Setor de meio de cultura em especial a Maria Aparecida Galvão, Vilma Gonçalves, Iraci Galles e Milene de Carvalho pelo suporte dado durante todo desenvolvimento do experimento.

Ao Setor de Lavagem e Esterilização em especial ao Senhor Nilton Eustáquio, Sônia Ferreira, Marjorie da Costa, Delma Amaral, Paulo Roberto pela amizade e presteza com que sempre nos atendeu.

Ao Setor de Reprodução Gráfica em especial ao Jésus Lima pela presteza e amizade.

Ao Núcleo de Informática em especial aos Senhores Roger Guerra, Fábio Militão e Rogério Rocha, pelo apoio, suporte e amizade.

Ao Serviço de Comunicação Social em especial ao Senhor Frederico Guilherme Pelo apoio e amizade.

Ao Setor de Manutenção em especial ao amigo José Norton da Silva pela presteza e amizade.

À Fazenda Experimental de Pedro Leopoldo:

Em especial aos amigos José Antônio Rodrigues, Sr. Luiz Resende de Oliveira e Luiz Lucas de Oliveira, pela dedicação, presteza e amizade demonstrada.

A amiga Olga Maria Chaves Cardoso e aos seus filhos Fernando e Rodrigo pelo carinho com que me acolheram durante minha estadia na Fazenda.

Ao Centro Tecnológico de Minas Gerais-CETEC:

Em especial ao Dr. Paulo Eustáquio, Iara Martins, Carlos Alberto, Cid Barreira e ao estagiário Leonardo Macieiro pela colaboração, presteza e amizade.

Aos membros da Banca Examinadora Professores Maria Beatriz Abreu Glória, Célia Lúcia Fortes ferreira, Rômulo Cerqueira leite, Ivan Barbosa Machado Sampaio e ao Pesquisador Luiz Guilherme Heneine, pela colaboração e valorização deste trabalho.

Ao Pesquisador Luiz Simeão do Carmo por ter aceito o convite do Colegiado de Pós-Graduação da Escola de Veterinária para participar da banca examinadora como convidado especial.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Queridos amigos:

Daqui não vou levando apenas os conhecimentos que vim buscar, esses com certeza eu levaria. Daqui vou levando muito mais, vou levando uma saudade imensa de uma grande família que formei ao logo desses quatro anos. A vocês queria dizer algo que nunca alguém tivesse pronunciado no mundo, mas não encontrei nenhuma palavra que substituísse o "OBRIGADA". Muito obrigada a vocês por terem me adotado durante esses anos de permanência aqui. Um obrigada especial ao Sr. Roberto Camargo e Família, Dr. Agenor e Família, as queridas tias Terezinha, Íris, Margarida, Maria, Tereza, Cida, Leninha, Senhora Maria Lúcia, aos meus avós queridos Vô Zizi, Vô Maria Prata e Vô Lahyre, aos queridos amigos Beth, Sérgio, Sílvia, Vandilma, Rose, Robson, Alberto, Nádia, Edvard, Ivone, Ana Maria, Miguel, Célia, Reinaldo, Lígia, Geralda, Marina, Vademmy, Camila, Janice, Sandra, João Marcelo, Fabiano Santana, Marcos, André, Luís Eduardo, Cássia, Ana Célia, Sueli, Felipe, Luíza Leite, Christina, Rejane, Glauco, Amilton, Ivon, Luciana, André, Marilene, Wellington, Edna, Filomena, Márcia, Loura, Tânia, Míriam, Francisco, Selenita, Neuza, Lucinéa, Sr. Raimundo, Álvaro, Virgínia, Corina, aos queridos sobrinhos Lucas, Nadine, Déborah, Gabriel, Isabela, Amanda, Fernando, Leonardo, Bruno, Luíza, Alberto, Clara Nina e Victor. Sem vocês com certeza tudo teria sido muito difícil.

Espero ter deixado um pouco de mim com vocês. Fiquem certos que, de vocês vou levando muito.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	14
RESUMO GERAL	15
GENERAL SUMMARY	16
INTRODUÇÃO	17
REVISÃO DE LITERATURA	18
1. <i>Staphylococcus</i> sp	18
2. Enterotoxinas estafilocócicas	19
3. Toxina da síndrome do choque tóxico	19
4. Ocorrência de <i>Staphylococcus</i> e enterotoxinas em leite e derivados	20
5. Fatores que contribuem para a ocorrência de <i>Staphylococcus</i> sp e enterotoxinas em queijos	21
5.1. Saúde animal e resistência a antibióticos	21
5.2. Condições higiênico sanitárias	21
5.3. Uso de conservantes no leite visando controlar a proliferação de microrganismos	22
1. EXPERIMENTO I. Isolamento e identificação de <i>Staphylococcus</i> sp em queijos coalho comercializados em Recife-PE.	23
Resumo	23
Summary	23
1.1 Introdução	23
1.2. Material e métodos	25
1.2.1. Amostragem	25
1.2.2. Métodos de análise	25
1.2.2.1. Isolamento e identificação do microrganismo	25
Preparo da amostra	25
Inoculação por espalhamento	25
Isolamento e enumeração de <i>Staphylococcus</i> sp	25
Caracterização bioquímica	26
1.3. Resultados e Discussão	28
1.4. Conclusões	30
2. EXPERIMENTO II. Produção de enterotoxinas por <i>Staphylococcus</i> sp isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE, utilizando os métodos de Sensibilidade Ótima em Placas e ELISA sanduíche	29
Resumo	29
Summary	29
2.1. Introdução	30
2.2. Material e Métodos	31
2.2.1. Material	31
2.2.2. Métodos	31
Indução de produção de enterotoxinas	31
Preparo e purificação dos anticorpos	31
Preparo do conjugado	32
Detecção de enterotoxinas pelo método de Sensibilidade Ótima em Placas	33
Detecção de enterotoxinas pelo método de Elisa sanduíche	33
2.3. Resultados e Discussão	34
2.4. Conclusões	38

3. EXPERIMENTO III. Produção da Toxina da Síndrome do Choque Tóxico por de <i>Staphylococcus aureus</i> Isolados de Queijos Coalho Comercializados em Recife-PE	39
Resumo	39
Summary	39
3.1. Introdução	39
3.2. Material e Métodos	40
Indução de produção de toxinas.	40
Detecção da toxina	40
3.3. Resultados e discussão	41
3.4. Conclusão	41
4. EXPERIMENTO IV. Susceptibilidade antimicrobiana de <i>Staphylococcus</i> sp isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE	42
Resumo	42
Summary	42
4.1. Introdução	42
4.2. Material e métodos	43
4.3. Resultados e discussão	44
4.4. Conclusão	47
5. EXPERIMENTO V. Efeito inibitório da Nisina e do Sistema Lactoperoxidase no crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> enterotoxigênicos durante a produção de queijo frescal	48
Resumo	48
Summary	48
5.1. Introdução	48
5.2. Material e métodos	50
Material	50
Preparo do inóculo	50
Fabricação dos queijos	50
Métodos de análise	53
Análise estatística	53
5.3. Resultados e Discussão	53
5.3.1. Controle físico-químico, bioquímico e microbiológico do leite cru e pasteurizado	53
5.3.2. Qualidade dos queijos	54
5.4. Conclusão	57
CONCLUSÕES E SUGESTÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
APÊNDICE	68

LISTA DE FIGURAS

1.1.	Percentual de amostras de queijos coalho comercializadas em Recife-PE, positivas para <i>Staphylococcus</i> sp.	26
1.2.	Percentual de amostras de queijos coalho comercializados em Recife-PE com contagens variando de 10^5 a 10^7 UFC/g de <i>Staphylococcus</i> sp.	27
1.3.	Frequência de <i>Staphylococcus</i> sp em amostras de queijos coalho comercializados em Recife-PE.	28
2.1.	Molde segundo Food Research Institute usado para perfuração dos poços em ágar nobre (medidas em mm).	33
2.2.	Deteção de enterotoxinas pelo método OSP a partir de cepas de <i>S.aureus</i> isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE.	34
2.3.	Deteção de enterotoxinas pelo método ELISA sanduíche a partir de cepas de <i>S. aureus</i> isoladas de queijos coalho comercializados em Recife-PE.	35
2.4.	Deteção de enterotoxinas pelo método ELISA sanduíche a partir de cepas de <i>S. coagulase-negativa</i> isoladas de queijos coalho comercializados em Recife-PE.	36
2.5.	Deteção de enterotoxinas pelo método ELISA sanduíche a partir de cepas de <i>S.intermedius</i> isoladas de queijos coalhos comercializados em Recife-PE.	37
2.6.	Deteção de enterotoxinas pelo método ELISA sanduíche a partir de cepas de <i>S. hyicus</i> isoladas de queijos coalho comercializados em Recife-PE.	38
3.1.	Produção de TSST-1 à partir de cepas de <i>S.aureus</i> isoladas de queijos coalho comercializados em Recife-PE.	41
4.1.	Resistência de diferentes cepas de <i>Staphylococcus</i> sp a diversos antibióticos.	45
4.2.	Percentual de cepas de <i>Staphylococcus</i> sp resistentes a diferentes antibióticos.	45
5.1.	Fluxograma de fabricação dos queijos.	52

LISTA DE TABELAS

4.1.	Percentual de cepas de <i>Staphylococcus</i> resistentes a diferentes antibióticos.	46
5.1.	Ingredientes utilizados nos grupos experimentais.	53
5.2.	Resultados médios de análises microbiológicas de amostras de leite cru e pasteurizado.	54
5.3.	Valores médios de pH de queijos frescal fabricados com leite inoculado com <i>S.aureus</i> e adicionados dos conservantes LPS ou nisina e armazenados a 10 ou 30°C por 48 horas.	55
5.4.	Contagem média de <i>S.aureus</i> isolados de queijos frescal fabricados com leite inoculado com <i>S.aureus</i> e adicionados dos conservantes LPS ou nisina e armazenados a 10 ou 30°C por 48 horas.	56

RESUMO GERAL

Vários tipos de intoxicação alimentar atingem a população humana em todo o mundo. Dentre os microrganismos envolvidos em intoxicações e na produção de metabólitos capazes de causar tais enfermidades, bactérias do gênero *Staphylococcus* têm sido uma das mais comumente relacionadas. Certas cepas desse microrganismo produzem enterotoxinas termoestáveis que são veiculadas ao homem pelo consumo de alimentos, causando intoxicações caracterizadas por vômito, diarreia e dor abdominal. A ocorrência desse tipo de doença é elevada em vários países, inclusive no Brasil, destacando-se o consumo de produtos de origem animal, principalmente queijos frescos como uma das fontes de transmissão mais frequentes. Portanto, foram conduzidos cinco experimentos a partir de 107 amostras de queijos coalho comercializados em Recife, PE com o objetivo de isolar e identificar *Staphylococcus* sp; investigar o potencial de cepas isoladas em produzir enterotoxinas dos tipos A, B, C e D e de toxinas da síndrome do choque tóxico (TSST-1); verificar a susceptibilidade das cepas isoladas aos antimicrobianos mais comumente utilizados no tratamento de mastites contagiosas bovinas; e, finalmente, avaliar o efeito inibitório de conservantes permitidos pela legislação brasileira sobre o crescimento de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicos isolados. Das cepas isoladas, 377 foram identificadas como: *S. aureus* (218), *S. coagulase-negativa* (96), *S. hyicus* (41) e *S. intermedius* (22). As espécies isoladas foram submetidas a indução de produção de enterotoxinas pelo método de membrana sobre ágar. Utilizando-se os métodos de sensibilidade ótima em placas e ELISA para detecção das enterotoxinas, observou-se que todas as espécies isoladas e identificadas foram capazes de produzir enterotoxinas. Cepas de *S. aureus* foram também capazes de produzir TSST-1. Quanto a resistência múltipla a antimicrobianos observou-se, de um modo geral, um maior percentual de cepas resistentes à Penicilina G, com um valor médio de 71,5 %, sendo maior a resistência para o *S. aureus* (87,4%). Maior sensibilidade foi observada com relação a gentamicina e vancomicina, com percentuais de 100 e 96,2 %, respectivamente. A gentamicina, demonstrou, neste estudo, ser o antibiótico de maior efetividade frente a *Staphylococcus* sp isolados de queijos coalho. Os conservantes testados, nas concentrações utilizadas não apresentaram efeitos inibitórios significativos ($p > 0,05$) sobre o desenvolvimento de cepas de *S. aureus* durante a elaboração de queijos frescos, armazenados a 10 e a 30 °C, quando comparados com os controles.

Palavras-chave: *Staphylococcus* sp, queijo coalho, enterotoxinas, TSST-1, OSP, ELISA, sistema lactoperoxidase, nisina.

GENERAL SUMMARY

Epidemiological profile, resistance to antibiotics and to the preservatives nisin and lactoperoxidase system of *Staphylococcus* sp isolated from "coalho" chesse marketed in Recife, PE, Brazil. Many types of foodborne diseases reach mankind throughout the world. Among those microorganisms involved in diseases and in metabolites production, which are able to cause illness, *Staphylococcus* has been one of the most commonly related. Some strains of this microorganism produce heat stable enterotoxins, which are transmitted to man by foods' intake, causing intoxications characterized by vomiting, diarrhea, abdominal pain. The occurrence of this disease is high in several countries, including Brazil, stressing animal's origin products intake, mainly artisanal cheeses, as one of the most frequent transmission sources. Thus, five trials were carried out from 107 "coalho" cheese samples marketed in Recife, PE, Brazil with the objective to isolate and identify *Staphylococcus* sp; to investigate the potential for enterotoxins (SEA, SEB, SEC and SED) and toxin (TSST-1) production by the isolated strains; to investigate the susceptibility of isolated strains to antimicrobials commonly used for bovine contagious mastitis treatment; and, finally, to evaluate the inhibitory effect of preservatives approved by the Brazilian legislation against growth of isolated enterotoxigenic *S. aureus* during "frescal" cheese manufacture. Among the 637 isolated strains of *Staphylococcus* sp, 377 were identified as: *S. aureus* (218), *S. coagulase-negative* (96); *S. hycus* (41) and *S. intermedius* (22). The strains were induced to produce toxins by the membrane over agar method. Using Optimum sensitivity plate and ELISA methods, it was observed that all the isolated and identified species were potentially able to produce enterotoxins. *S. aureus* was also capable of producing TSST-1. With respect to resistance to antimicrobials, it was observed that a higher percentage of strains were resistant to Penicillin G (71.5 %), with higher resistance observed by *S. aureus* (87.4 %). High resistance was also observed for novobiocin, ranging from 57,1 % for *S. intermedius* and 76,7 % for *S. coagulase-negative*. Higher sensibility was observed to gentamicin and vancomycin with values of 100 and 96.2 %, respectively. Gentamicin, was observed to be the best antibiotic against *Staphylococcus* sp isolated from "coalho" cheese. The tested preservatives, according to the recommended concentrations, did not show significant inhibitory effect ($p > 0.05$) on *S. aureus* growth during "frescal cheese", manufacture stored either at 10° C or at 30° C, when compared to the control samples.

Key words: *Staphylococcus* sp, "coalho" cheese, enterotoxins, TSST-1, OSP, ELISA, LPS, nisin.

1 INTRODUÇÃO

O queijo coalho, produto elaborado com leite cru adicionado de coalho e sem adição de cultura láctica, é valorizado pela população nordestina e pelos turistas, sendo utilizado diariamente na culinária regional em acompanhamento de pratos típicos como carne de sol e macaxeira (*manihot esculenta*), recheio para tapioca, cuscuz, além de ser servido como sobremesa tendo como cobertura o mel de engenho. Ultimamente tem sido consumido assado no espeto nas praias e em eventos públicos. Apesar de ser um produto popular e fazer parte da cultura da região, não existem dados estatísticos que permitam estimar a produção média anual do mesmo, uma vez que sua produção é basicamente informal, sem existir uma fiscalização oficial.

A produção de queijo coalho é uma prática comum em Pernambuco e nos demais Estados da região Nordeste do Brasil. A maior parte do produto é fabricada de forma artesanal em pequenas indústrias ou em pequenas queijarias urbanas ou rurais. O leite utilizado para sua fabricação normalmente não é submetido a qualquer tratamento térmico, sendo o produto elaborado com leite cru. Deve-se salientar que o leite é geralmente obtido sem os cuidados básicos de higiene. Não existe padronização no processo de fabricação quanto ao tempo de coagulação, tipo de coalho utilizado, prensagem, salga e teor de umidade do produto final. Deste modo, pode-se encontrar no mercado, uma grande variedade de queijos coalho, sem atender a um padrão de identidade ou de qualidade. Além das deficiências observadas na obtenção da matéria prima e durante o seu processamento, estes queijos são geralmente expostos à venda sem refrigeração, à temperatura ambiente, nos supermercados, mercados públicos, padarias e feiras livres.

O leite, por ser um produto de elevado valor nutritivo, torna-se um excelente meio para o desenvolvimento de microrganismos desejáveis e indesejáveis. Entre estes microrganismos estão aqueles que

deterioram o leite e seus derivados, interferindo diretamente no valor nutritivo e na qualidade sensorial dos mesmos. Existem também aqueles responsáveis por toxinfecções alimentares, colocando em risco a saúde dos consumidores, como por exemplo *Staphylococcus* sp, *Salmonella* sp, *Campylobacter* sp, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Destes, a intoxicação por *Staphylococcus* tem sido considerada uma das mais comuns sendo o queijo um dos alimentos mais envolvidos (Carmo e Bergdoll, 1990).

A ocorrência de surtos de origem alimentar é uma realidade tanto em países subdesenvolvidos como em países desenvolvidos. No Brasil foram registrados 593.212 casos de intoxicação de origem alimentar no período de 1984 a 1997 (Brasil, 1998). São vários os fatores que contribuem para os surtos de origem alimentar. Dentre eles, pode-se citar: matéria-prima de qualidade insatisfatória, temperatura inadequada de armazenamento, má higienização dos equipamentos e dos utensílios, tratamento térmico inadequado, manipuladores sem conhecimentos básicos de higiene, além de acondicionamento em temperatura e condições insatisfatórias nos pontos de distribuição e comercialização.

Considerando que o queijo coalho é consumido em grande quantidade no Nordeste do Brasil, e que apresenta deficiências na sua qualidade e fabricação, o seu consumo pode representar risco à saúde humana. Torna-se necessário, portanto, caracterizar a qualidade do queijo coalho quanto a presença de *Staphylococcus* sp, avaliar seu potencial enterotoxigênico e propor medidas viáveis para minimizar a contaminação e, consequentemente, reduzir o risco à saúde dos consumidores.

Assim sendo, este trabalho teve como objetivos:

1. estudar a frequência de *Staphylococcus* sp e identificar as espécies presentes em amostras de queijos coalho fabricados

- artesanalmente no Estado de Pernambuco e comercializados em Recife no período de janeiro a maio de 1997;
2. avaliar a enterotoxigenicidade das espécies isoladas por meio de provas imunológicas;
 3. determinar o comportamento das cepas de *Staphylococcus* sp frente a antibióticos comumente usados no tratamento de mastites bovinas; e avaliar a eficiência dos conservantes nisina e do sistema lactoperoxidase no crescimento de estirpes enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* durante a fabricação e armazenamento (10 e 30°C) de queijo fresco.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O leite é um alimento de grande valor nutritivo, fornecendo ao homem macro e micro nutrientes necessários ao seu crescimento, desenvolvimento e manutenção de sua saúde (Gurr, 1992). Como fonte de carboidratos, vitaminas, proteínas, lípidos e sais minerais, o leite constitui-se também em excelente meio para o desenvolvimento de microrganismos desejáveis, deteriorantes e patogênicos (Chen & Hotchkess, 1993). Estes microrganismos podem contaminar o leite durante ou após a ordenha e consequentemente os derivados de leite, os quais podem ainda sofrer contaminação durante processamento e estocagem, principalmente nos casos em que há grande manipulação do produto (Nout, 1994).

Entre os microrganismos que podem contaminar o leite e seus derivados, *Staphylococcus* sp tem sido considerado um dos mais freqüentemente envolvidos em surtos de intoxicação alimentar, juntamente com *Salmonella* sp e *Escherichia coli* (Davis & Wilbey, 1990).

Staphylococcus sp

Em 1880, Ogston, um pesquisador norte americano, descreveu uma bactéria que ao

microscópio apresentava-se em forma de cocos agrupados em cacho, relacionando-a a várias patologias humanas. Em 1882, essa bactéria foi denominada *Staphylococcus*, do grego *staphyle* - cachos de uvas - e *coccus* - grãos (Baird-Parker, 1990). Em 1884, Rosenbach obteve uma cultura pura do *Staphylococcus*. A partir daí, essa bactéria passou a ser pesquisada devido a sua importância na indústria de alimentos e na medicina, sendo um dos patógenos mais envolvidos em surtos de origem alimentar (Franco & Landgraf, 1996).

O primeiro relato de intoxicação envolvendo o *Staphylococcus* foi associado à ingestão de uma torta de carne. Em 1885, Stenberg descreveu um surto decorrente da ingestão de queijo contendo *Staphylococcus* em Michigan, nos Estados Unidos, EUA (Baird-Parker, 1990). Certamente vários casos de intoxicação estafilocócica ocorreram no passado, porém pouco progresso na identificação do agente foi obtido. Em 1914, Barber, investigando um surto envolvendo leite proveniente de uma fazenda nas Filipinas, atribuiu este fato a uma toxina produzida pela bactéria, sem, entretanto, demonstrar a presença da referida toxina em filtrados da cultura. Dack e seus colegas pesquisadores da Universidade de Chicago (EUA) demonstraram que o surto foi realmente causado por uma toxina produzida por *Staphylococcus*, sendo os resultados da investigação publicados em 1930 (Bergdoll, 1990). Entre as espécies estafilocócicas, *Staphylococcus aureus* é o agente mais comumente envolvido em surtos de intoxicação alimentar. Porém, espécies como *S. intermedius* já foi descrita como agente de surto de intoxicação alimentar (Kambhaty et al., 1994).

Os *Staphylococcus* pertencem a família Micrococaceae, que apresenta quatro gêneros: *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Planococcus* e *Stomatococcus* (Murray, 1995). Segundo Kloos (1990), existem 27 espécies e 7 subespécies conhecidas de *Staphylococcus*, cuja heterogeneidade reflete na grande variedade das propriedades genéticas, fisiológicas e bioquímicas das espécies. Morfologicamente, os estafilococos

caracterizam-se como cocos Gram positivos, imóveis, não esporulados, catalase, termonuclease e coagulase positivos ou negativos, anaeróbios facultativos, medindo cerca de 0,5 a 1 µm de diâmetro (Kloos & Lambe Jr, 1991). Além do seu envolvimento em surtos devido a síntese de enterotoxinas (Ichickawa et al., 1996), são causadores de várias doenças no homem e nos animais. Estas bactérias têm como habitat natural pele e mucosa de mamíferos e estão diretamente envolvidos em inflamações intramamárias de fêmeas em lactação (Owens et al., 1993). No homem, são responsáveis por infecções cutâneas e de mucosas, infecções septicêmicas, estando geralmente associadas a infecções viscerais ou ósseas (Anderson, 1983).

2. Enterotoxinas estafilocócicas

Enterotoxinas estafilocócicas são polipeptídeos de cadeia simples com quantidade relativamente grande de lisina, ácidos glutâmico e aspártico. Apresentam peso molecular variando de 26.000 a 29.000 Daltons e ponto isoelétrico de 7,0 a 8,6 (Tranter, 1991). São resistentes à enzimas proteolíticas (pepsina, tripsina, renina e papaina) e são também termo-resistentes. Apresentam como sítio de ação o sistema gastrointestinal. A quantidade requerida para produzir doença em indivíduos sensíveis é variável, podendo ser de 100 ng a 1 µg (Bergdoll, 1990; Asperger, 1994).

Atualmente, nove diferentes tipos de enterotoxinas estafilocócicas (SE's) foram identificadas: SEA (Casman, 1960); SEB (Bergdoll et al. 1959); SEC e SED (Bergdoll et al., 1965; Casman et al., 1967); SEE (Bergdoll et al., 1971); SEG (Munson & Betley, 1991); e SEH (Su & Wong, 1995). A primeira enterotoxina identificada foi denominada de SEB, sendo em seguida identificada a SEA, que foi designada desta maneira por ser a principal enterotoxina isolada de intoxicações alimentares. As enterotoxinas B, C₁, C₂, C₃, E e H foram identificadas por pesquisadores do Food Research Institute, enquanto A e D foram identificadas por pesquisadores do Food

and Drug Administration dos Estados Unidos.

Uma vez pré-formadas no alimento e ingeridas na dose mínima de 0,05 µg/Kg de peso corpóreo, estas enterotoxinas provocam vômito e diarreia, sintomas característicos da intoxicação estafilocócica. Porém vale salientar que experimentalmente, 50 % dos voluntários que receberam 0,01 µg/Kg de SEA apresentaram a sintomatologia característica. Talvez esse fato possa ser explicado por ser esta enterotoxina a mais toxigênica de todas. A dose emética para macacos é de 5 a 20 µg/animal, via intragástrica e de 0,02 a 0,5 µg/animal, via endovenosa (Bergdoll, 1989).

A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos que contém quantidades suficientes de uma ou mais enterotoxinas. A frequência desta intoxicação tem sido estimada nos Estados Unidos em um a dois milhões de casos por ano. A estocagem dos alimentos em temperaturas inadequadas ou falta de higiene na manipulação destes produtos têm sido descritos como os principais fatores relacionados a esta alta frequência (Bean et al., 1990).

3. Toxina da síndrome do choque tóxico

Além das enterotoxinas, algumas linhagens de *Staphylococcus aureus* produzem uma toxina designada como toxina da síndrome do choque tóxico (Toxic Shock Syndrome Toxin, TSST-1). Esta toxina causa sintomas caracterizados por febre, congestão dos vasos, hipotensão e choque letal (Bergdoll & Chesney, 1991). A toxina é descrita como sendo um polipeptídeo de cadeia simples, com peso molecular de 22.000 Daltons e ponto isoelétrico igual a 7.2.

Alguns pesquisadores relacionam a produção da TSST-1 com a produção de enterotoxinas. Takeuchi et al. (1998), trabalhando com 272 cepas de *S. aureus* isolados de leite provenientes de portadores de mastite subclínica e clínica e de leites estocados em tanques de expansão,

concluíram que a TSST-1 era produzida associada com a produção de SEC. Keny et al. (1992) analisando 262 cepas, demonstraram que 20 % dos isolados produziam TSST-1 em associação com SED. Não foi encontrado, no entanto, na literatura consultada relatos de intoxicação alimentar envolvendo esta toxina. Além disto, dados sobre a produção dessa toxina por cepas isoladas de queijos ou outros produtos manufaturados também não foram encontrados na literatura consultada.

4. Ocorrência de *Staphylococcus* sp e enterotoxinas em leite e derivados

Surtos de intoxicação estafilocócicas associados com leite e produtos lácteos têm sido relatados tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (Sharp, 1987). No Reino Unido, Wieneke et al. (1993) relataram a ocorrência de 359 casos de intoxicação alimentar devido a enterotoxina estafilocócica no período de 1969 a 1990. Do total de casos, 8 % ocorreram devido a ingestão de leite e derivados contaminados. Na Índia, Gill et al. (1994) relataram uma frequência de 18,71 % de amostras de leite cru positivas para *Staphylococcus aureus*. Em produtos lácteos, a frequência foi de 18,13 %, sendo que 17,30 % dos queijos analisados apresentaram-se contaminados.

No Brasil, vários estudos têm demonstrado alta contaminação de leite e derivados por *Staphylococcus aureus* (Carmo et al., 1994; Cerqueira et al., 1994b; Santos et al., 1995; Sena et al., 1998b). Araújo (1984) ao analisar 100 amostras de leite cru no município de Niterói, verificou que 50 % apresentaram-se positivas para *Staphylococcus aureus*, sendo que 48,0 % das amostras positivas apresentaram contagens variando de 10^3 a valores superiores a 10^5 UFC/mL. Santos et al. (1981) ao analisarem 78 amostras de leite cru em Minas Gerais, observaram que 46,9 % estavam contaminadas por este agente em contagens variando de $3,0 \times 10^3$ a $9,8 \times 10^5$ UFC/mL. Em Goiânia, Mesquita et al. (1988) detectaram *Staphylococcus aureus*

coagulase positiva em 71,4 % das amostras de leite cru (63) examinadas.

Além da alta contaminação verificada em leite cru, vários autores têm demonstrado elevada frequência de *Staphylococcus aureus* em queijos produzidos em diversas partes do mundo, inclusive incriminados em surtos (Marth, 1982; Ibrahim & Baldock, 1991). No Brasil, Gomes & Gallo (1995) observaram em leite cru e queijo Minas Frescal comercializados em Piracicaba, SP, contagens de $1,2 \times 10^3$ a $7,4 \times 10^5$ UFC/mL e de $4,78 \times 10^4$ a $1,4 \times 10^6$ UFC/g, respectivamente. Santos et al. (1995) ao avaliarem a qualidade microbiológica de 56 amostras de queijo coalho provenientes de Fortaleza, CE, observaram valores acima dos padrões em 62,5% das amostras. Segundo os autores, os principais fatores que contribuíram para esta contaminação foram uso de leite não pasteurizado com alta incidência de *Staphylococcus aureus*, contaminação do queijo pós-processamento e temperaturas inadequadas durante a manufatura e armazenagem. Carmo & Bergdoll (1990), ao analisarem 18 surtos de intoxicação estafilocócica pela ingestão de bolo e queijo Minas em Belo Horizonte, MG, detectaram enterotoxinas A e B em 12 dos surtos, somente enterotoxina A em um e B em outro. Dados na literatura sobre contaminação de queijos por *Staphylococcus* sp na região Nordeste são escassos.

Os relatos sobre identificação de enterotoxinas estafilocócicas em queijos Minas incluem trabalhos realizados por Mandil et al. (1982) que, ao analisarem 99 amostras colhidas em Belo Horizonte, MG, detectaram produção de enterotoxinas A, B, C, D e E em 91 das 236 culturas testadas. As enterotoxinas A, B e E foram igualmente predominantes.

Alguns relatos de detecção da TSST-1 em leite proveniente de vacas com mastite, encontram-se descritos na literatura. O primeiro foi feito em 1986, quando os pesquisadores Jones & Wieneke (1986) detectaram a toxina em leite de vacas com quadro severo de mastite.

5. Fatores que contribuem para a ocorrência de *Staphylococcus* sp em leite e derivados

Saúde animal e resistência a antibióticos

A mastite continua sendo a principal doença responsável pelas perdas econômicas ocasionadas a bovinocultura de leite (Kirk et al., 1994). Segundo Blosser, (1979), as perdas estimadas no período de 1970 até início de 1980, variaram de 35 a 295 dólares por vaca/ano. Estes prejuízos incluem perda na produção de leite, aumento dos custos de reposição dos animais, descarte de leite, aumento dos custos com drogas, assistência veterinária e mão-de-obra (Fetrow, 1980). A mastite subclínica, por sua vez, acarretou 10 a 11 % de perdas na capacidade produtiva total por vaca/ano. A diminuição na produção de leite por mastite subclínica foi mais importante economicamente do que a causada pela mastite clínica.

Adicionalmente ao impacto econômico da mastite aos produtores de leite, há perdas econômicas significativas para as indústrias de laticínios devido a baixa qualidade do leite. A mastite resulta, portanto, em redução significativa na quantidade e qualidade (composição) do leite. Para os produtores de leite, isto significa menor retorno devido a diminuição da produção e para as indústrias, significa numerosos problemas no processamento, diminuição do rendimento, da qualidade e da estabilidade dos laticínios.

Além de causar prejuízos econômicos aos produtores de leite e às indústrias de laticínios, os microrganismos envolvidos na etiologia da mastite podem causar importantes doenças no homem, como intoxicação estafilocócica, listeriose, campilobacteriose dentre outras.

A presença constante de *Staphylococcus* sp em leite e derivados, pode está relacionada ao fato deste apresentar elevada resistência aos antimicrobianos usados comumente na terapia da mastite bovina. Owens et al. (1997) citam que a média de insucesso nas

terapias varia de 03 a 92 % durante a lactação. Essa resistência está relacionada com uma série de interações entre o patógeno e o hospedeiro envolvido, dentre estas: baixa penetração da droga no tecido infectado, localização intracelular da bactéria, inatividade metabólica, atividade reduzida do antibiótico, a própria resistência bacteriana assim como a união da bactéria aos glóbulos de gordura (Craven & Anderson, 1984; Eng et al., 1991; Louhi et al., 1992; Myllys et al., 1992; Owens et al., 1993; Ali-Vehmas et al., 1997). Patógenos resistentes a antibióticos, dificultam a eficácia do tratamento aumentando os custos com saúde animal. Além disto, podem resultar em morbidade e mortalidade (Levy, 1982; AMERICAN..., 1995).

5.2. Condições higiênico - sanitárias

O leite, ao sair do úbere, possui uma microbiota variável de 500 a 1000 microrganismos/mL, representada por micrococos e bacilos não patogênicos (Skovgaard, 1990; Teuber, 1992). Da obtenção até a comercialização, vários fatores podem afetar negativamente a qualidade do leite, contaminando o produto ou favorecendo a proliferação de patógenos importantes em saúde pública.

A contaminação do leite inicia-se nas fazendas, durante ou após a ordenha, sendo resultado de deficiências da higienização do meio ambiente e dos utensílios, doenças do rebanho e do homem. As dificuldades de transporte e as falhas durante os processos de beneficiamento e estocagem do leite também podem interferir na sua qualidade (Borges et al., 1978; Durel, 1983). O controle deficiente em qualquer uma destas etapas pode causar sérios problemas.

As fontes de contaminações usualmente encontradas no ambiente, no homem e no animal podem oferecer riscos indesejáveis e a partir destes pontos verifica-se o início do ciclo evolutivo na transmissão de doenças à população consumidora. Merecem destaque a brucelose, a tuberculose, as infecções estreptocócicas, intoxicações por

endotoxinas estafilocócicas, salmonelose, listeriose, campilobacteriose, yersiniose e doenças causadas por *E. coli* patogênicas, como a O157:H7 (Zadow, 1989).

A garantia da qualidade do leite, principalmente para evitar veiculação de doenças ao homem, se inicia com o atestado sanitário da vaca, do ordenhador, das condições sanitárias do ambiente em que as vacas são ordenhadas, do equipamento usado na coleta e transporte do leite, bem como do tratamento aplicado ao leite. A garantia da qualidade depende ainda das condições higiênico-sanitárias durante a produção, do tratamento térmico, da temperatura de armazenamento do leite na propriedade, durante o transporte até a indústria, assim como os cuidados na rede de distribuição e no consumo (Santos, 1981). Cada fase exige o mais rigoroso cuidado sanitário para não tornar frustrada toda a operação.

Uso de conservantes no leite visando controlar a proliferação de microrganismos.

Vários fatores afetam a proliferação de microrganismos em alimentos e diversas interações sinérgicas e antagônicas têm efeitos significativos em seu crescimento. Muitos pesquisadores têm tentado estudar simultaneamente, em diferentes níveis, alguns destes fatores que afetam o crescimento microbiano, tais como temperatura, pH, atividade de água, concentração de NaCl (Buchanan & Phillips, 1990; Buchanan, 1993), uso de produtos como sorbato de sódio (Lahellec et al., 1981; Narasimhan et al., 1989), nisina (Davies et al., 1997), liozima (Lodi, 1990) e sistema lactoperoxidase (Kamau et al., 1990). Alguns microrganismos têm sido testados frente a estes aditivos, podendo

ser destacados a *Listeria monocytogenes* e o *Staphylococcus aureus* (Kamau et al., 1990; Davies et al., 1997).

Alguns produtos, classificados como conservantes foram recentemente aprovados pela legislação brasileira, afim de minimizar o crescimento de patógenos em alimentos. Segundo a Portaria nº 146, publicada no Diário Oficial em 11 de março de 1997 (Brasil, 1997), são permitidas as adições de sorbato de sódio, nisina, liozima, nitrato de sódio e potássio e natamicina em leite destinados a fabricação de queijos. Dois produtos comerciais, um a base de nisina e outro tendo como princípio ativo o sistema lactoperoxidase foram aprovados recentemente para uso em alimentos processados (entre eles, leite e derivados) pelo Ministério da Agricultura.

Embora estes conservantes tenham sido aprovados para uso em produtos lácteos, não há dados disponíveis sobre a sua eficiência na literatura brasileira. Alguns destes produtos têm sido recomendados para matéria-prima com baixas contagens microbianas (Davies et al., 1997). Este fato gera dúvidas sobre sua eficiência em relação ao leite produzido no Brasil, o qual caracteriza-se geralmente por alta carga microbiana. Como a contagem microbiana média de *Staphylococcus aureus* em leite cru no Brasil, está em torno de 10^5 UFC/mL, há riscos de produção de enterotoxinas e desencadeamento de intoxicação alimentar (Bergdoll, 1990). Considerando este aspecto, a simples recomendação de uso de conservantes, não isenta os alimentos de causarem quadros de intoxicação alimentar. Desta forma, verifica-se a necessidade de avaliar a eficiência destes produtos frente a estirpes enterotoxigênicas isoladas de queijos brasileiros, uma vez que não existe na literatura trabalhos demonstrando essa eficiência.

1. Experimento I

Isolamento e identificação de *Staphylococcus* sp em queijos coalho comercializados em Recife-PE

Resumo

Este trabalho teve como objetivo isolar e identificar *Staphylococcus* sp em queijos coalho comercializados em Recife-PE. Amostras de queijo foram coletadas aleatoriamente, de Janeiro a Maio de 1997, em estabelecimentos comerciais que acondicionavam o produto em temperatura ambiente (29 – 33 °C). As mesmas foram enviadas sob refrigeração por via aérea até Belo Horizonte, MG. As análises dos queijos foram processadas nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias. Das 107 amostras analisadas, 98,1 % apresentaram-se contaminadas com 10^3 a 10^7 UFC de *Staphylococcus* por grama de queijo, com valor médio de 10^6 UFC/g. Contagens de 10^5 a 10^6 representaram 79 % das amostras e de 10^7 UFC/g, 12,4 %. Colônias típicas e atípicas foram identificadas por meio dos testes de coloração de Gram, coagulase, temonuclease, glicose (anaerobiose), manitol (anaerobiose e aerobiose), hemólise e catalase. Foram isoladas 637 cepas das quais 377 foram identificadas como: *Staphylococcus aureus* (58 %), *S. coagulase-negativa* (25 %), *S. hyicus* (11 %) e *S. intermedius* (6 %). A presença dessas espécies nos queijos analisados e os níveis encontrados, demonstram risco potencial à saúde pública.

Palavras chave: *Staphylococcus* sp, queijo coalho, *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. coagulase-negativa*.

Summary

Isolation and identification of *Staphylococcus* species in "coalho cheese" marketed in Recife-PE, Brazil. The objective of this work was to isolate and identify *Staphylococcus* sp in "coalho cheese" market in Recife-PE, Brazil. Samples of coalho cheese were randomly

collected during January to May, 1997 from stores which commercialized the cheese at room temperature (29 – 33 °C). The samples were shipped under refrigeration to Belo Horizonte, MG. The samples were analyzed at the Laboratories of Food Microbiology and Staphylococcal Enterotoxins of Fundação Ezequiel Dias. Among 107 samples analyzed, 98.1 % were contaminated with 10^3 to 10^7 CFU of *Staphylococcus* per gram of cheese, mean value of 10^6 CFU/g. Counts from 10^5 to 10^6 represented 79% of samples and of 10^7 CFU/g, 12.4 %. Typical and atypical colonies were identified through the tests: Gram, coagulase, thermonuclease, glucose (anaerobic conditions), mannitol (anaerobic and aerobic conditions), haemolysis and catalase. From the 637 isolates of *Staphylococcus*, 377 were identified as: *S. aureus* (58 %), *S. coagulase-negative* (25 %), *S. hyicus* (11 %) and *S. intermedius* (6 %). The presence of such species and the counts detected in the samples of coalho cheese indicate potential health risk.

Key words: *Staphylococcus* sp, "coalho" cheese, *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. coagulase-negative*.

1.1. Introdução

O leite, por ser um alimento de alto valor nutritivo, é um excelente meio para o desenvolvimento de microrganismos desejáveis, indesejáveis e deteriorantes. Dentre os microrganismos indesejáveis, os *Staphylococcus* se destacam como uma das mais importantes causas de intoxicação alimentar proveniente de leite e derivados (Dohnalek-Halpin & Marth, 1989; Davis & Wilbey, 1990). Intoxicações estafilocócicas têm ocorrido no mundo todo e são, provavelmente, as que ocorrem com maior frequência (Berdgoll, 1979; Bean et al., 1990; Bean & Griffin, 1990).

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de investigar os níveis de contaminação do leite por *Staphylococcus* sp. Na Índia, Gill et al. (1994) relataram uma frequência de 18,71 % de amostras de leite cru positivas para *Staphylococcus aureus*. Santos et al. (1981) ao analisarem 78 amostras de leite cru em Minas Gerais, observaram que 46,9% das amostras estavam contaminadas com *S. aureus*, com contagens que variaram de $3,0 \times 10^3$ a $9,8 \times 10^5$ UFC/mL. Araújo (1984), ao analisar 100 amostras de leite cru proveniente de Pirassununga, SP, verificou que 50% eram positivas para *S. aureus*, sendo que 48,0 % das amostras positivas apresentaram contagens entre 10^3 e 10^5 UFC/mL. Em Goiânia, GO, Mesquita et al. (1988) analisando 63 amostras de leite cru, isolaram *S. aureus* em 71,4 % das amostras. Gomes & Gallo (1995), analisando leite cru em Piracicaba, SP, observaram contagens de $1,2 \times 10^3$ a $7,4 \times 10^5$ UFC/mL.

Diversas pesquisas têm demonstrado alta contaminação de produtos derivados do leite, principalmente queijos, por *Staphylococcus* sp. Kivanc (1989), ao estudar a qualidade microbiológica de três tipos de queijos comerciais na Turquia, observou que 60 % das amostras de queijo Savah, 35% de queijo branco e 30% de queijo Van Herby estavam contaminadas com *Staphylococcus* sp. Gill et al. (1994) estudando a qualidade de queijos comercializados na Índia concluíram que 17,3 % dos queijos estudados, estavam contaminados com o microrganismo. De Luca et al. (1997), ao analisarem 135 amostras de queijos na Bolonha-Itália, observaram que 22 amostras eram positivas para *Staphylococcus*.

No Brasil, vários trabalhos indicaram a presença de *Staphylococcus* em queijos, inclusive amostras associadas à ocorrência de surtos de intoxicação alimentar (Santos et al., 1981; Cerqueira et al., 1994a; Carmo et al., 1994). De acordo com os dados da Fundação Ezequiel Dias, de 341 amostras de alimentos envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar, analisados no período de dezembro de 1985 a dezembro

de 1990, 106 foram de queijo Minas Carmo et al., (1994). Além destes dados, Cerqueira et al. (1994a) relataram a ocorrência de surto epidêmico de toxinfecção alimentar envolvendo queijo tipo Minas frescal em Pará de Minas, MG. Neste episódio, 15 indivíduos estiveram expostos à possível fonte de infecção (quatro queijos manufaturados com leite cru). A taxa de ataque foi de 93,33% e a contagem de *S. aureus* observada foi de $4,1 \times 10^6$ UFC/g. Gomes & Gallo (1995), avaliando a qualidade de queijo Minas frescal comercializados em Piracicaba, SP, observaram contagens de *S. aureus* variando de $4,8 \times 10^4$ a $1,4 \times 10^6$ UFC/g de queijo. Gonçalves & Franco (1996), analisando 30 amostras de queijo Minas Frescal comercializados no município de Niterói, RJ, verificaram que 50% das amostras estavam contaminadas com *S. aureus*, com contagens variando de $5,0 \times 10^4$ a $1,2 \times 10^6$ UFC/g.

Vários fatores estão relacionados com a elevada frequência de *Staphylococcus* em queijos. Um deles seria os níveis elevados destes microrganismos no leite cru, e sua utilização na elaboração desses queijos (Pereira et al., 1991). Outros fatores estão associados à contaminação do produto devido a condições higiênicas deficientes no local de obtenção do leite e fabricação do queijo, e à utilização de temperatura inadequada no transporte, armazenamento e comercialização do produto (Santos et al., 1995). Dentre os queijos mais problemáticos, aqueles tipo frescal consistiriam no maior risco de veiculação de toxinfecções, devido as suas características de identidade e tecnológicas. Somente nos últimos anos estes casos têm despertado a atenção dos órgãos oficiais de saúde pública em diversas cidades do Brasil (Carmo & Bergdoll, 1990).

Considerando que o queijo coalho é consumido em grande quantidade no Nordeste brasileiro (em praças, praias, eventos públicos, acompanhamento de pratos regionais), que seu processo de fabricação é geralmente feita com leite cru, de forma artesanal, que a qualidade higiênico-sanitária do leite utilizado na

fabricação desse queijo é insatisfatória e que este leite pode apresentar contagens elevadas de microrganismos patogênicos, o consumo deste produto, geralmente não inspecionado, pode constituir um risco à saúde pública. Diante do exposto torna-se necessário um estudo criterioso visando conhecer a frequência de *Staphylococcus* sp em queijos coalho fabricados artesanalmente no Estado de Pernambuco e comercializados em Recife.

1.2. Material e Métodos

1.2.1. Amostragem

Cento e sete amostras de queijos coalhos foram coletadas de forma aleatória durante 10 semanas, em intervalos de sete dias, no comércio varejista de Recife-PE, no período de janeiro a maio de 1997. Os queijos eram originários de cidades cujas distâncias entre o centro produtor e o centro distribuidor variavam de 70 a 300 km. No momento da coleta, foram verificadas e registradas temperatura dos balcões de venda e foram ainda observadas as condições higiênico-sanitárias dos locais onde o produto era exposto. Para que as amostras obtidas representassem mais adequadamente o comércio varejista da cidade de Recife-PE, os queijos foram adquiridos de mercados localizados em regiões geográficas diferentes. Os mesmos foram acondicionados em embalagens de polietileno de primeiro uso, colocados em caixa isotérmica sob refrigeração e enviados imediatamente por via aérea, para Belo Horizonte, MG. Logo após a chegada, as amostras foram levadas para os Laboratórios de Microbiologia e de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias, onde foram analisadas quanto a presença, contagem, isolamento e identificação de *Staphylococcus* sp.

1.2.2. Métodos de análise

1.2.2.1. Isolamento e identificação do microrganismo

Preparo da amostra. Foram homogeneizadas 25g da amostra em 225 mL de água peptonada tamponada, para

obtenção da diluição 10^{-1} e, a partir desta, foram preparadas diluições até 10^{-4} (Lancette & Tatini, 1992).

Inoculação por espalhamento. Sobre a superfície de placas de Petri contendo ágar Baird-Parker, foram espalhadas com auxílio de alça de Drigalski, 0,1 mL de cada diluição preparada (em duplicata). Após este procedimento, as placas inoculadas foram invertidas e incubadas a 37°C, durante 48 horas.

Isolamento e enumeração de *Staphylococcus* sp. Para a enumeração de *Staphylococcus* sp, foram contadas colônias típicas e atípicas de cada placa. O resultado foi multiplicado pelo inverso da diluição e por 10, resultando no total de UFC/g de queijo. As colônias típicas foram caracterizadas por apresentarem coloração negra, com brilho, puntiformes e circundada por um halo de lipase e outro transparente mais externo de lecitina. Colônias atípicas cinzentas mucóides, desprovidas de halo e colônias negras, com apenas um halo ou sem halo, foram também pescadas. Cinco colônias típicas e dez atípicas, representativas de cada amostra analisada, foram transferidas com o auxílio de alça, para o ágar PCA (Plate Count Agar) inclinado e incubadas por 24 h a 37 °C. Após esse tempo foram submetidas ao teste de coagulase livre, sendo considerados como resultados positivos, coagulase 4+, 3+, 2+ e 1+. Os resultados obtidos foram expressos em UFC de *Staphylococcus* sp por grama do produto (Lachica et al., 1969; Lancette & Tatini, 1992).

Caracterização bioquímica. As 637 cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas foram submetidas a testes bioquímicos para identificação das respectivas espécies. Os testes, que incluíam a coloração pelo método de Gram, produção de termonuclease; capacidade de lisar hemácias de carneiro, e de produzir ácido e gás, à partir de glicose (anaerobiose) e de manitol (anaerobiose e aerobiose), foram feitos segundo metodologias propostas por Mac Faddin (1980), Kloos(1990), ver Apêndice.

1.5. Resultados e Discussão

Das 107 amostras de queijo coalho

analisadas, 105 (98,1%) apresentaram-se contaminadas com *Staphylococcus*, conforme ilustrado na Figura 1.1.



Figura 1.1. Percentual de amostras de queijos coalho comercializadas em Recife-PE positivas para *Staphylococcus* sp.

A contaminação de amostras de queijo coalho por *Staphylococcus* sp observada neste estudo é superior àquelas descritas na literatura, o que pode estar relacionado diretamente com a qualidade da matéria prima utilizada para a elaboração do produto. De Luca et al. (1997), demonstraram que de 135 amostras de queijos analisados na Bolonha, Itália, 22 estavam positivas para *Staphylococcus*. Estudos realizados por Santos et al. (1995), avaliando a qualidade de queijos coalho comercializados em Fortaleza-CE, demonstraram que 62,5 % das amostras de queijo coalho, estavam contaminadas com este microrganismo. Do mesmo modo, Cerqueira et al. (1994b) encontraram que 43,33% de amostras de queijo Minas Frescal comercializados em Belo Horizonte, MG analisadas, estavam contaminadas com o microrganismo. Estudos realizados por Santos et al. (1981) indicaram um menor percentual de contaminação (15,2%) ao analisarem queijos Minas comercializados em Belo Horizonte, MG. Porém, esta menor contaminação pode ser explicada pelo fato do queijo ter sido fabricado com leite pasteurizado sendo a presença do microrganismo consequência de

contaminação pós-processamento.

O elevado percentual de contaminação de amostras de queijos coalho comercializados em Recife encontrado neste estudo pode ser atribuído, principalmente, a utilização de leite cru na elaboração do produto, associado a manipulação, condições higiênico - sanitárias insatisfatórias e falta de refrigeração no armazenamento do produto tanto na fonte de produção como no comércio (29 a 33°C). Além disso as condições de higiene dos "boxes" onde os mesmos são expostos à venda na maioria das vezes é insatisfatória. Em muitos casos o produto fica em cima dos balcões sujeito a contaminações por moscas e outros insetos. Associado a isso existe o agravante relacionado com a falta de cuidados higiênicos do vendedor na comercialização.

As contagens de *Staphylococcus* variaram de 10^3 a 10^7 UFC/g, com um valor médio de 10^6 UFC/g. Conforme indicado na Figura 1.2, as contagens abaixo de 10^5 UFC/g representaram 8,6% das amostras (4/105), de 10^5 a 10^6 UFC/g corresponderam a 79% (83/105) e em 12,4% dos queijos analisados

(13/105) a contagem foi equivalente a 10^7 UFC/g. Estes resultados coadunam com os dados descritos por Carmo & Bergdoll (1990) que em estudo realizado no período

de 1985 a 1990, observaram que 84,8% dos queijos analisados apresentaram contagens variando de 10^6 a 10^8 UFC/g.

Gráfico 2: Contagens (UFC/g) de *Staphylococcus* sp

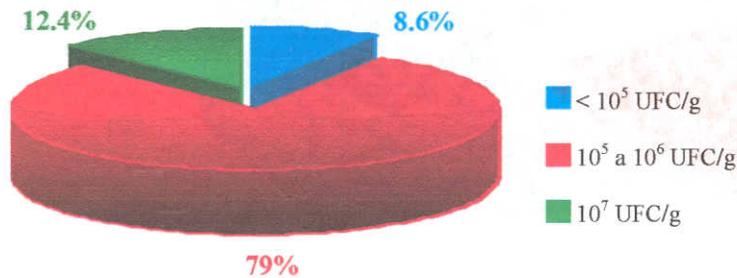


Figura 1.2. Percentual de amostras de queijos coalho comercializados em Recife-PE com contagens de *Staphylococcus* sp variando de 10^5 a 10^7 UFC/g.

Das 637 cepas isoladas 377 foram identificadas como *Staphylococcus* sp assim distribuídas: 218 (58%) de *S. aureus*; 96 (25%) de *S. coagulase-negativa*; 41 (11%) de *S. hyicus* e 22 (6%) de *S. intermedius* (Figura 1.3). Portanto *Staphylococcus aureus* foi a espécie mais freqüente neste estudo. Vários estudos confirmam a presença desta espécie em queijos. Santos et al. (1981) avaliando a qualidade microbiológica de queijos Minas frescal observou contagens de *Staphylococcus aureus* em níveis maiores que 10^6 UFC/g em 57,44 % das amostras.

Outras espécies de *Staphylococcus* foram também isoladas e identificadas neste estudo. Embora, *S. aureus* seja o mais comumente envolvido em surtos de

intoxicação alimentar, já existe relato de surto envolvendo outras espécies como *S. intermedius* relatado por Khambaty et al., (1994). A baixa ocorrência de intoxicação alimentar envolvendo esta bactéria pode, segundo Talam et al. (1989), ser explicada pelo fato desta espécie não ser comumente isolada de humanos, considerados uma das principais fontes de contaminação de alimentos por *Staphylococcus* (Bergdoll, 1989; Carmo et al., 1994). A detecção desta espécie neste estudo, demonstra a existência de outras possíveis fontes de contaminação do queijo coalho, representadas por infecções em animais, conforme descrito por Devriese et al. (1985).

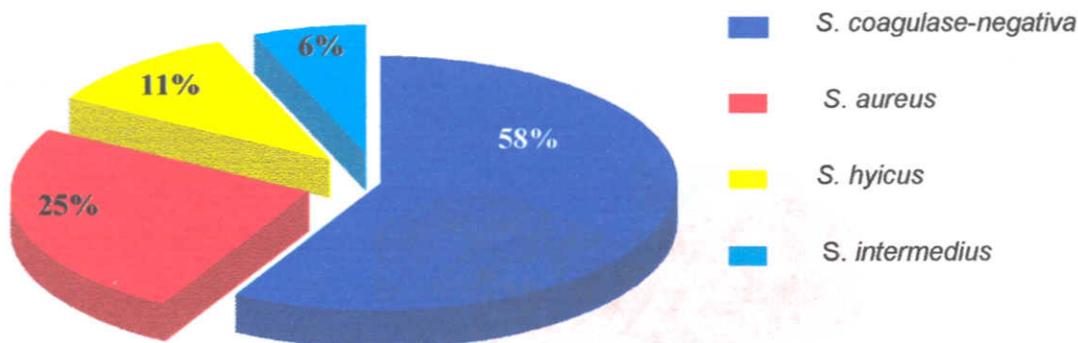


Figura 1.3. Frequência de *Staphylococcus* sp em amostras de queijos coalho comercializados em Recife-PE.

A frequência de amostras positivas para *S. coagulase-negativa* observada neste estudo são semelhantes àquelas obtidas por De Luca et al. (1997). Estes pesquisadores demonstraram que de 135 amostras de queijos analisados na Bolonha, Itália, o *S. epidermidis*, que é uma espécie coagulase-negativa, apresentava-se como uma das espécies mais comumente encontradas. Em um estudo realizado no México, entretanto, a frequência foi mais elevada. De Aguayo et al. (1992) observaram que das 170 amostras de leite pasteurizado estudadas, 105 (61,7 %) estavam contaminadas por *S. epidermidis*. Neste mesmo estudo constatou-se que 31 amostras de leite em pó e 27 amostras de leite ultra-pasteurizado representando 93 e 90 % das amostras estavam contaminadas por essa espécie. Este fato pode estar relacionado ao aumento da incidência desta espécie em casos de mastite bovina (Devriese et al., 1985).

A alta frequência de *Staphylococcus* observada em queijos coalho pode ser

ainda explicada pelo processamento tecnológico empregado, ou seja, fabricação artesanal, utilizando-se leite cru sem tratamento térmico e sem manipulação em condições higiênicas adequadas.

1.6. Conclusões

Queijos coalho comercializados em Recife-PE apresentam alta contaminação por *Staphylococcus* sp, potencialmente capazes de produzir enterotoxinas.

O consumo deste produto, apresentando níveis de contaminação encontrados neste estudo pode se constituir em risco a saúde pública.

A detecção de espécies como *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. coagulase-negativa* e *S. hyicus* sugerem contaminação do leite e/ou do queijo a partir do homem e dos animais.

2. Experimento II

Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* sp isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE, utilizando os métodos de Sensibilidade Ótima em Placas e ELISA sanduíche

Resumo

Este trabalho teve como objetivo, determinar o potencial de produção de enterotoxinas por pools de cepas de *Staphylococcus* isoladas de queijos coalho comercializados em Recife-PE. Os pools foram induzidos a produzir enterotoxinas, em condições laboratoriais, pelo Método de Membrana sobre Ágar. Os extratos obtidos foram testados quanto a presença de enterotoxinas pelo método de imunodifusão em gel - Sensibilidade Ótima em Placas (OSP). Dos 78 pools de *S. aureus* testados, SEB foi produzida por 61,5 %; SEC por 12,9 % e SED por 2,5 %. Dos 11 pools de *S. intermedius* estudados, 63,6 % produziram apenas SEB. Os pools de *S. coagulase-negativa* (55) e de *S. hyicus* (26) não produziram enterotoxinas. Os pools negativos na prova OSP foram testados pelo ELISA sanduíche. Com relação ao *S. aureus*, 25,6 % dos 78 pools eram positivos para SEA; 16,6 % dos 30 pools foram positivos para SEB; 32,3 % dos 68 pools foram positivos para SEC; e 17,1 % dos 76 pools foram positivos para SED. Para o *S. coagulase-negativa*, dos 55 pools testados, 18,2 % foram positivos para SEA; 16,3 % para SEB; 41,8 % para SEC; e 20 % para SED. Considerando os 11 pools de *S. intermedius* testados para SEA, SEC e SED, os respectivos resultados de positividade foram: 27,2; 36,3 e 36,3 %. Dos 4 pools testados para a presença de SEB, todos foram positivos. Em relação aos 26 pools de *S. hyicus* testados para SEA, SEB, SEC e SED os resultados respectivos foram: 30,7; 19,2; 23,0 e 26,9 %. Assim sendo, um grande percentual de pools de cepas de *Staphylococcus* sp isoladas de queijo coalho apresentaram potencial de formação de enterotoxinas *in vitro*.

Palavras chave: enterotoxinas

estafilocócicas, queijo coalho, OSP, ELISA sanduíche.

Summary

Production of enterotoxins by *Staphylococcus* sp isolated from coalho cheese marketed in Recife-PE, using Optimun Sensitivity in Plate and ELISA sandwich. The objective of this work was to determine the potential for enterotoxins production by *Staphylococcus* pools isolated from coalho cheese marketed in Recife-PE. The pools were induced to produce enterotoxins under laboratory conditions using the membrane over agar method. The extracts obtained were tested for the presence of enterotoxins by gel immunodiffusion using the optimum sensitivity plate (OSP) method. Among 78 *S. aureus* pools tested, SEB was produced by 61.5 % of the pools; SEC by 12.9 % and SED by 2.5 %. Among 11 pools of *S. intermedius*, 63.6 % produced only SEB. *S. coagulase-negative* (55) and *S. hyicus* (26) pools did not produce enterotoxins. The pools which were negative by OSP were tested immunoenzimatically by the ELISA sandwich test. With respect to *S. aureus*, 25.6 % of the 78 pools were positive for SEA; 16.6 % of 30 pools for SEB; 32.3 % of 68 pools for SEC; and 17.1 % of 76 pools were positive for SED. For *S. coagulase-negative*, among 55 pools tested, 18.2 % were positive for SEA; 16.3 % for SEB; 41.8 % for SEC; and 20 % for SED. Pools (11) of *S. intermedius* tested for SEA, SEC and SED, provided the respective positive results: 27.2; 36.3 and 36.3 %. Among 4 pools tested for the presence of SEB, 100% were positive. With regard to the 26 pools of *S. hyicus* investigated for SEA, SEB, SEC and SED, the positive pools represented 30.7; 19.2; 23.0 e 26.9 %, respectively.

These results indicate that a large percentage of *Staphylococcus* sp pools isolated from coalho cheese showed potential for the *in vitro* formation of enterotoxins.

Key words: Staphylococcal enterotoxins, "coalho cheese" OSP, ELISA sandwich.

2.1. Introdução

A importância do *Staphylococcus aureus* sob o ponto de vista de saúde pública tem sido evidenciada através de levantamentos epidemiológicos relacionando-o a toxinfecções alimentares relatadas em todo o mundo (Genigeorgis, 1989). *S. aureus* tem sido reportado como um dos principais microrganismos contaminantes de leite cru e de queijos no Brasil (Pereira et al., 1996) e no mundo (Ewald, 1988; Gomez et al., 1992; Vernozy-Rozand et al., 1998).

Os *Staphylococcus* sintetizam enterotoxinas, que são termoestáveis e resistentes à enzimas proteolíticas como tripsina, quimotripsina, renina e papaína (Bergdoll, 1989). Estes metabólitos, quando ingeridos, podem causar intoxicações alimentares em humanos. No Brasil, alguns surtos desse tipo foram descritos e relacionados ao consumo de queijos artesanais (Santos et al., 1981; Carmo & Bergdoll, 1990; Cerqueira et al., 1994a). Nesse tipo de alimento o problema pode ser mais sério, uma vez que durante o processo de elaboração tais substâncias podem ser concentradas.

Segundo Valle et al. (1991), enterotoxinas estafilocócicas (SE's) são metabólitos extracelulares produzidos por certas cepas de *Staphylococcus aureus*. Até o momento foram identificados nove tipos diferentes de SEs: SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE, SEG e SEH (Wyatt, 1992; Park et al., 1996; Pereira et al., 1996; Su et al., 1996). As enterotoxinas tipo C são muito relacionadas entre si e podem ser identificadas por reações cruzadas com anticorpos preparados contra qualquer uma delas. As outras enterotoxinas são identificadas por anticorpos específicos para

cada uma, embora reações cruzadas entre SEB e SEC e entre SEA e SEE possam ocorrer (Bergdoll, 1990).

Intoxicação estafilocócica é causada pela ingestão de enterotoxinas produzidas em alimentos por algumas linhagens de *S. aureus* (Park et al., 1996). Crescimento de *S. aureus* enterotoxigênicos a uma população de pelo menos $5,0 \times 10^5$ células/g de alimento, geralmente é considerado necessário para a produção de uma quantidade de enterotoxina suficiente para causar intoxicação se o alimento for consumido (Park & Szabo, 1986; Newsome, 1988). Das enterotoxinas detectadas em alimentos, SEA é a mais comumente envolvida em surtos de intoxicação estafilocócica. Estudos indicam que 100 a 200 ng de SEA podem produzir sintomas de intoxicação (Evenson et al., 1988). A intoxicação pode originar sintomas de gastroenterite aguda.

Vários estudos têm sido desenvolvidos, demonstrando alta freqüência de *Staphylococcus* enterotoxigênicos em queijos. Todd et al. (1981), ao analisarem queijos tipo suíço implicados em toxinfecções alimentares, encontraram contagens médias que variavam de 10^4 a 10^6 UFC de *Staphylococcus/g*. De 186 amostras testadas para enterotoxina B, 72,6 % estavam positivas. Enterotoxina A foi detectada em 52,2 % das 122 amostras testadas. No Brasil, Mandil et al. (1982) analisando 99 amostras de queijos Minas, coletadas em Belo Horizonte, MG, detectaram presença de enterotoxinas A, B, C, D e E em 91 das 236 culturas testadas. As enterotoxinas A, B e E foram igualmente predominantes. Em outro estudo, Carmo & Bergdoll (1990), ao analisarem 18 surtos de intoxicação estafilocócica pela ingestão de bolo e queijo Minas em Belo Horizonte, MG, detectaram enterotoxinas A e B em alimentos incriminadas em 12 surtos. Entretanto, trabalhos que têm como objetivo a detecção de enterotoxinas estafilocócicas em leite e produtos derivados no Brasil ainda são incipientes, principalmente na região Nordeste do país.

Os métodos comumente utilizados para detectar enterotoxinas estafilocócicas em alimentos são radioimunoensaio, imunodifusão, aglutinação passiva reversa, "Western immunoblotting", aparelho "VIDAS" e ELISA (Freed et al., 1982; Morissette et al., 1990; Kraatz-Wadsack et al., 1991; Oliveira et al., 1994; Park et al., 1996; Su, 1997; Meyrand et al., 1998; Rasooly & Rasooly, 1998). Como a quantidade de enterotoxina necessária para causar sintomas de intoxicação é baixa (100 a 200 ng), o método utilizado deve ser altamente sensível e específico (Evenson et al., 1988; Park et al., 1996). Os métodos ELISA e radioimunoensaio são os mais sensíveis, entretanto o primeiro é o preferido por não utilizar materiais radioativos. Dentre os diferentes tipos de ELISA utilizados para a detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos, o ELISA sanduíche, com anticorpo marcado, tem se destacado dos demais pela rapidez e sensibilidade, produzindo os melhores resultados (Ewald, 1988; Morissette et al., 1991; Bhatti et al., 1994; Park et al., 1996). Como o teste de ELISA apresenta custo elevado, o mais recomendado seria utilizar um teste menos sensível como screening e submeter as amostras negativas ao teste de ELISA.

Uma vez que o queijo coalho apresentou contagens de *Staphylococcus* capazes de produzir enterotoxina (Sena et al., 1998b), torna-se necessário avaliar a enterotoxigenicidade das espécies estafilocócicas isoladas. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo determinar o potencial de produção de enterotoxinas por pools de cepas de *Staphylococcus* isoladas de queijos coalho comercializados em Recife-PE.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Material

Foram utilizados para esse estudo, 78 pools de *S. aureus*, 11 de *S. intermedius*, 55 de *S. coagulase-negativa* e 26 de *S. hyicus* isolados de queijos coalho. As toxinas utilizadas como padrão e os anti-soros específicos foram gentilmente cedidos pelo

Pesquisador Luiz Simeão do Carmo, do Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias. As análises foram feitas nos Laboratórios de Enterotoxinas Estafilocócicas e Imunologia da Fundação Ezequiel Dias. As soluções-tampões utilizados foram cuidadosamente preparados conforme indicado no Apêndice.

2.2.2. Métodos

Indução da produção de enterotoxinas.

Um pool de culturas jovens de *Staphylococcus* sp procedentes de uma mesma amostra de queijo, que apresentaram perfil bioquímico idêntico, foi obtido por incubação em caldo infuso de cérebro-coração (BHI) durante 24 h a 37 °C. Placas de membrana sobre ágar foram preparadas com 20 mL de ágar BHI simples, acrescido de 1% de extrato de levedura, recobertas com disco de membrana de diálise Spectra/Por (Spectrum Labs, EUA) de 100 mm para proteínas de 6.000 a 8.000 Daltons. As placas foram inoculadas com 0,5 mL do inóculo do pool e incubadas a 37 °C por 24 h. As culturas obtidas foram lavadas com 2,5 mL de PBS 0,02 M pH 7,4 em duas etapas (1,5 e 1,0 mL, respectivamente). O líquido da lavagem foi centrifugado sob refrigeração a 10.000 x g a 4 °C por 15 minutos, e o sobrenadante foi utilizado para averiguação de produção de enterotoxinas pelos métodos de OSP (Robbins et al., 1974) e ELISA sanduíche (Ewald, 1988).

Preparo e purificação dos anticorpos. Os soros contendo os respectivos anticorpos foram obtidos por imunizações de coelhos e cedidos pelo Pesquisador Luiz Simeão do Carmo para ser utilizado neste experimento.

Os anticorpos foram purificados pelo método de cromatografia em coluna de imunoafinidade preparada com sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio (Thompson et al., 1986; PRINCIPLES..., 1993) conforme descrito a seguir. Inicialmente, 0,57 g de sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio foi pesada, adicionada de 40 mL de HCl 1 mM, deixando em repouso por 15 min., o que

resultou em um gel. Este gel foi centrifugado 5 vezes com HCl 1 mM a 3000 rpm a 4 °C durante 5 min, e por mais duas vezes com tampão bicarbonato utilizado como tampão de ligação. Após esse procedimento, o tampão foi descartado e imediatamente adicionado o ligante (enterotoxina) correspondente, na proporção de 10 mg/mL de gel. A coluna foi submetida a agitação lenta por 2 h à temperatura ambiente para uma perfeita homogeneização entre o ligante e o gel. Em seguida a mesma foi centrifugada e o sobrenadante separado para dosagem de proteína (espectrofotômetro à 280 nm). Na etapa seguinte efetuou-se o bloqueio dos grupos que permaneceram ativos utilizando-se etanolamina 1 M, deixando sob agitação por 2 h à temperatura ambiente. Após esse procedimento a coluna foi lavada alternadamente por cinco vezes com tampão acetato e tampão carbonato, sendo a última lavagem feita com tampão PBS.

A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 com 10 vezes o volume da coluna. A amostra foi equilibrada com o mesmo tampão usado na coluna (anti-soro+10 % do tampão) e aplicada. A coluna foi lavada com 20 mL de Tris-HCl 0,1 M e Tris-HCl 0,01 M pH 8,0 com a finalidade de retirar as substâncias não ligadas a mesma. A etapa seguinte consistiu na eluição dos componentes ligados a coluna com glicina-HCl 0,1 M pH 2,5. Os componentes eluídos foram neutralizados com Tris-HCl 1M, pH 8,0 na proporção de 10 % do volume coletado. Após a coleta, a coluna foi regenerada com 20 mL do tampão Tris-HCl 0,1 M, o eluído foi dialisado contra tampão PBS 0,01 M em câmara fria, sendo feitas quatro trocas. Após essa etapa foi verificada a concentração de proteína em espectrofotômetro à 280 nm.

Após a purificação dos anticorpos, os mesmos foram testados quanto a sua especificidade. Cada anticorpo foi testado pelo método de ELISA frente a cada uma das enterotoxinas (A, B, C e D). As reações cruzadas foram eliminadas passando o eluído na coluna de imunoafinidade correspondente a enterotoxina, até que não fosse observada nenhuma reação cruzada,

torando o anticorpo específico para cada uma das enterotoxinas. Após esse processo, as imunoglobulinas foram tituladas para obtenção de uma reatividade específica. Uma curva padrão foi construída para cada enterotoxina utilizando-se as respectivas enterotoxinas purificadas reagindo com suas imunoglobulinas homólogas. Desta curva padrão foram calculadas as concentrações nas amostras testadas. Uma vez determinada essa concentração, o material foi liofilizado e estocado para ser utilizado no preparo do conjugado específico para cada enterotoxina.

Preparo do conjugado. O preparo do conjugado foi feito utilizando-se o método do *m*-periodato de sódio descrito por Nakane & Kawoai (1974). Inicialmente foram dissolvidos 5,0 mg de peroxidase (HRP, Sigma, P8375) em 1,2 mL de água destilada. Foi preparada uma solução fresca de *m*-periodato de sódio 0,1 M em água destilada. Desta solução foram retirados 0,2 mL e adicionados à solução de peroxidase, a qual adquire coloração verde. A solução foi colocada sob agitação lenta por 20 min., em temperatura ambiente, sendo logo depois dialisada durante 12 horas em 2 L de tampão de acetato de sódio 1,0 mM, pH 4,0 a 4 °C. Uma solução contendo 10 mg de imunoglobulina (IgG) em 1,0 mL de PBS foi também dialisada por 12 h em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M pH 9,5. Após a diálise, o pH da solução de peroxidase foi ajustado para 9,0-9,5 com a adição de 40 µL do tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,2 M pH 9,5. A esta mistura, foi adicionada imediatamente a solução contendo IgG de coelho, ficando sob agitação lenta por 2 h, em temperatura ambiente para uma homogeneização perfeita. Uma solução de borohidreto de sódio foi preparada e 100 µL adicionado à peroxidase, ficando em repouso por 2 h a 4 °C. Essa solução foi então dialisada em 2 L de tampão borato por 12 h a 4°C. O conjugado preparado foi alíquotado, acondicionado em tubo eppendorf e congelado, para posterior uso no teste de ELISA sanduíche.

Deteccção de enterotoxinas pelo método de Sensibilidade Ótima em Placas. Os extratos ou sobrenadantes obtidos na indução da produção de enterotoxinas foram submetidos ao método Sensibilidade Ótima em Placas (OSP), de acordo com Robbins et al. (1974). Três mililitros de Ágar Nobre fundido foram adicionados às placas de Petri 50 x 12 mm. Uma vez solidificado, o ágar foi perfurado de forma a constituir sete orifícios, seguindo molde próprio (Figura 2.1), confeccionado pelo Food Research Institute (Madison, Wisconsin, EUA). O anticorpo específico na diluição (1:16) foi colocado no orifício central. A enterotoxina padrão foi disposta nos dois orifícios menores na concentração de 4 µg e a amostra teste foi adicionada nos quatro orifícios mais externos. As placas foram incubadas a 37 °C por 24h em câmara úmida. Reações positivas foram determinadas pela formação de linhas de precipitina formadas entre as amostras e o anticorpo correspondente.

Deteccção de enterotoxinas pelo método ELISA sanduíche. A deteção de enterotoxinas foi feita utilizando o método de ELISA sanduíche descrito por Ewald (1988). Foram utilizadas placas de microtítulos contendo 96 "well's" para o processamento das análises. Inicialmente

as placas foram sensibilizadas com o anticorpo específico para cada enterotoxina diluído em PBS no volume de 100 µL em cada 'well'. Em seguida, as placas foram colocadas sob refrigeração por 12 horas. Após esse período, as mesmas foram lavadas duas vezes com solução de lavagem (NaCl + Tween-20 + H₂O destilada q.s.p.). A etapa seguinte consistiu no bloqueio das placas com PBS contendo 3 % de albumina bovina. As placas foram incubadas a 37 °C por 1 h. Novamente foram lavadas por duas vezes e adicionadas de 100 µL dos sobrenadantes a serem testados diluídos em tampão PBS tween-20 0,05 % sendo incubadas por 1 h a 37 °C. Logo em seguida, após a lavagem (duas vezes), foi adicionado às placas 100 µL do conjugado diluído em tampão PBS tween-20 0,05 % mais 5 % de soro de camundongo 'germ free' sendo então incubadas por mais 1 h a 37 °C, e lavadas seis vezes. A etapa seguinte consistiu na adição do substrato (OPD + tampão citrato + H₂O₂). As placas foram novamente incubadas no mesmo tempo e temperatura. Após esse período a reação foi interrompida com 20 µL de H₂SO₄ (1:20) e procedeu-se a leitura no leitor de ELISA a 492 nm.

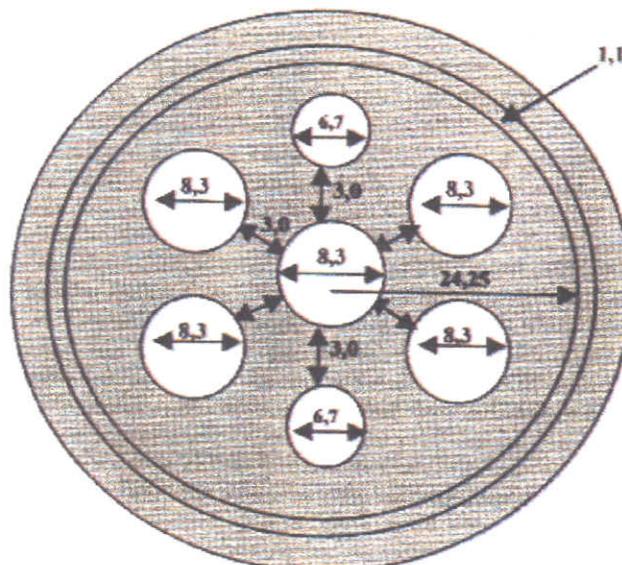


Figura 2.1. Molde segundo Food Research Institute usado para perfuração dos poços em ágar nobre (medidas em mm).

2.3. Resultados e Discussão

Os pools das cepas de *S. aureus* testados quanto ao potencial de produção de enterotoxinas, apresentaram os seguintes

resultados pelo método de OSP (Figura 2.2): dos 78 pools testados, 48 (61,5%) produziram SEB; 10 (12,9%) SEC e 2 (2,5%) produziram SED. Não foi detectada a SEA.

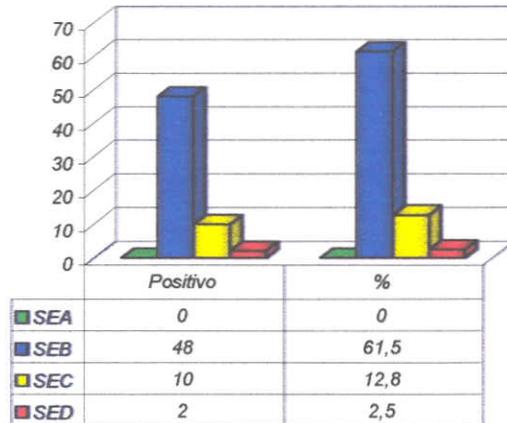


Figura 2.2. Detecção de enterotoxinas pelo método OSP a partir de cepas de *S. aureus* isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE.

Trabalhos realizados por Reyes et al. (1984), verificaram a produção em maior frequência de enterotoxinas estafilocócicas tipos A e D em queijos, utilizando método da microplaca associado ao teste de imunodifusão em ágar. Enterotoxinas SEB e SEC foram também detectadas, mas em um número menor de cepas. Em nosso estudo portanto foram observadas produção das quatro enterotoxinas em um número maior de cepas.

Sabioni et al. (1988) revelaram a presença de enterotoxinas A,B,D e E em queijos Minas frescal contaminados por *S. aureus* porém não foi detectada enterotoxina C como neste estudo. Em outro estudo, Carmo et al. (1994) verificaram a presença de SEA, SEB e SEC em amostras de queijo branco associadas com surto de intoxicação alimentar em Minas Gerais, trabalhando com o método OSP, porém nesse estudo não foi detectada a presença de SED. A não detecção de enterotoxinas por esse método pode ser explicada pela menor sensibilidade

do mesmo ou ainda pela baixa produção apresentada pelas cepas.

Gomes & Gallo (1995) isolaram *Staphylococcus aureus* de queijo Minas frescal comercializado em Piracicaba, SP, entretanto, nenhuma das 23 linhagens foi produtora de enterotoxina, empregando-se o método OSP, diferindo portanto dos nossos resultados quando foi observada produção de algumas enterotoxinas por este método revelando assim risco potencial pelo consumo desse produto.

Com relação às outras espécies de *Staphylococcus* isoladas observou-se que, dos 11 pools de *S. intermedius* investigados, 7 (63,6%), produziram apenas SEB. Os pools de *S. coagulase-negativa* (55) e de *S. hyicus* (26) não produziram enterotoxinas. Segundo Bergdoll (1995), a não detecção de enterotoxinas pode ser explicada em parte pela menor sensibilidade do método OSP, quando comparado com outras técnicas. Pequenas quantidades de enterotoxinas (10 a 20 ng/mL de

sobrenadante) podem não ser detectadas por esse método.

A maior detecção de enterotoxina tipo B (SEB) observada neste estudo, confirma os relatos de Carmo & Bergdoll (1990) que descreveram esta enterotoxina como a mais frequentemente associada a surtos de toxinfecção alimentar, juntamente com a SEA. A não detecção da SEA neste trabalho pode estar relacionada a concentração em níveis inferiores a 1 µg, concentração esta, limite para o método (Robbins et al., 1974).

Os pools que apresentaram resultados negativos no método de Sensibilidade Ótima em Placas, foram testados pelo Método de ELISA sanduíche, método este de maior sensibilidade. Foram encontrados os seguintes resultados: dos 78 pools de *Staphylococcus aureus* testados para presença de SEA, 20 (25,6%) apresentaram-se positivos. Dos 30 pools testados para SEB, 5 (16,6%) foram positivos. Dos 68 pools investigados para SEC, 22 (32,3%) foram positivos. E, dos 76 pools pesquisados para a presença de SED, 13 (17,1%) foram positivos (Figura 2.3).

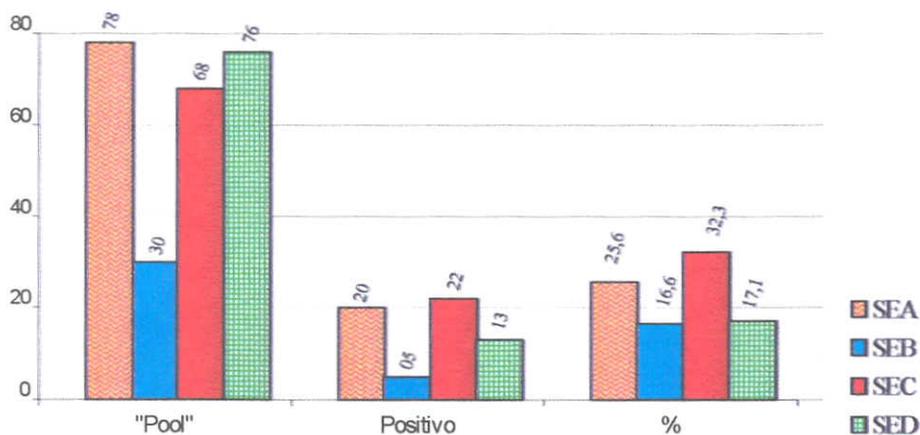


Figura 2.3. Detecção de enterotoxinas pelo método ELISA sanduíche a partir de cepas de *S. aureus* isoladas de queijos coalho comercializados em Recife-PE.

Resultados semelhantes ao do presente estudo foram observados por Bautista et al. (1988) que analisaram 87 cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de leite de ovelha na Espanha. Estes autores verificaram que todas essas cepas produziram SEA, SEB, SEC e SED. Porém, nesse trabalho, a maioria das cepas isoladas produziu principalmente SEA e SED, diferindo dos resultados deste experimento onde foram observadas maior produção de SEB e SEC. Da mesma forma, Lapeyre et al. (1988) utilizando a técnica de ELISA duplo sanduíche, detectaram SEA,

SEB, SEC e SED em amostras de leite e queijo envolvidos em intoxicação alimentar.

Gómez-Lúcia et al. (1992), estudaram a produção de enterotoxinas em queijo tipo Manchego maturado, elaborado com leite inoculado com várias cepas de *S. aureus*. As enterotoxinas detectadas foram SEA e SED. Tais resultados diferem dos resultados encontrados neste estudo onde a enterotoxina C e B também foram detectadas.

Com relação ao *Staphylococcus* coagulase-negativa, os 55 pools testados pelo método de ELISA apresentaram os seguintes resultados: 10 (18,1 %) foram positivos para SEA; 9 (16,3 %) para SEB; 23 (41,8 %) para SEC; e 11 (20 %) para SED (Figura 2.4). Um dos pools testados não produziu enterotoxina.

A detecção de enterotoxinas a partir de cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa é importante do ponto de vista de saúde pública, porque a legislação brasileira não especifica padrões para estes microrganismos, restringindo-se apenas, a descrever valores para espécies coagulase-positivas. Além disto, deve-se ressaltar a elevada frequência deste microrganismo na etiologia dos processos de mastite bovina (Makaya et al., 1996). A atividade da

coagulase tem sido usada para indicar patogenicidade de um isolado toxigênico e a termonuclease tem sido sugerida como um indicador mais confiável desta enterotoxigenicidade (Bennett, 1996). Portanto, sugere-se que estes dois parâmetros sejam avaliados simultaneamente. Evidências sugerem que a produção de enterotoxinas é uma característica de várias espécies de *Staphylococcus*. Bergdoll (1989) e Genigeorgis (1989) ao revisarem relatos identificando enterotoxinas produzidas por *S. aureus* típicas e atípicas, contradisseram os postulados anteriores de que somente *S. aureus* são enterotoxigênicos, reafirmando que *Staphylococcus* coagulase-negativa e outras espécies não caracterizadas como *S. aureus* podem causar riscos a saúde.

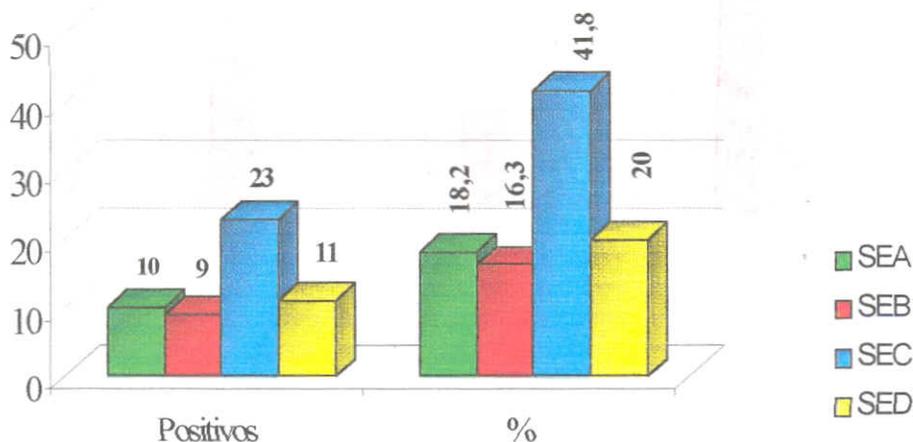


Figura 2.4. Detecção de enterotoxinas pelo método ELISA sanduíche a partir de cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa isoladas de queijos coalho comercializados em Recife-PE.

As espécies coagulase-negativa identificadas neste estudo, segundo a chave de provas bioquímicas para identificação de espécies estafilocócicas proposta por Kloos (1990), poderiam ser classificadas como *Staphylococcus epidermidis*. Porém, vale ressaltar que, independente da espécie, esse é um dado de suma importância uma vez que as mesmas mostraram-se

potencialmente capazes de produzir enterotoxinas. Bennett (1996) chama atenção para o envolvimento de outras espécies que não *Staphylococcus aureus* e espécies coagulase-negativa potencialmente capazes de produzir enterotoxinas e, conseqüentemente, causar surtos de intoxicação alimentar. Este estudo demonstrou o potencial de produção de

enterotoxinas por espécies estafilocócicas coagulase-negativa o que vem chamar atenção com relação ao possível envolvimento dessas espécies em surtos de intoxicação alimentar, demonstrando assim que somente a atividade da coagulase não define a enterotoxigenicidade da espécie, como postulam vários pesquisadores.

Baseado nos resultados deste trabalho, é importante ressaltar que em relação ao risco a saúde pública não só o *Staphylococcus aureus* ou as espécies coagulase-positiva merecem atenção, e sim qualquer espécie potencialmente capaz de produzir enterotoxinas. Levando em consideração esses aspectos, a legislação brasileira deveria se referir às espécies produtoras de enterotoxinas quando da liberação de alimentos para consumo humano.

Foram testados pelo método de ELISA os 11 pools de *S. intermedius*. Com relação à presença de SEA, SEC e SED, que não foram detectados no teste OSP, observou-se os seguintes resultados (Figura 2.5): 3 (27,2 %), 4 (36,3 %) e 4 (36,3 %) positivos, respectivamente, conforme indicado na Figura 2.5). Os 4 pools de *S. intermedius*, que também não apresentaram produção de SEB no teste OSP, pelo método de ELISA foram 100% positivos. Bautista et al. (1988), analisando amostras de leite de ovelha na Espanha, verificaram que das 124 cepas de

Staphylococcus isoladas, três de *S. epidermidis* produziram enterotoxinas, detectadas pelo método de ELISA. Essas cepas produziram SEB, SEC e SED, mas não produziram SEA, como também observado nesse trabalho.

O primeiro surto de intoxicação envolvendo *S. intermedius*, foi descrito por Khambaty et al. (1994) o qual envolvia o consumo de produtos a base de manteiga. A detecção de enterotoxinas pelo método ELISA demonstrou que das 22 cepas isoladas, 16 produziram somente SEA, e 2 cepas produziram somente SEC. A produção de enterotoxinas por essa espécie vem reforçar a teoria de que não só o *Staphylococcus aureus* é potencialmente capaz de produzir enterotoxinas.

Em relação aos 26 pools de *S. hyicus* testados para presença de SEA, SEB, SEC e SED, os resultados respectivos foram: 8 (30,7 %), 5 (19,2 %), 6 (23,07 %) e 7 (26,9 %) conforme indicado na Figura 2.6. A produção de enterotoxinas pelo *S. hyicus* isolados de queijos coalho mostra a necessidade de um estudo mais criterioso sobre o envolvimento desta espécie em surtos de toxinfecção alimentar, uma vez que estudos experimentais também já revelaram a produção de enterotoxinas por esta espécie (Adesiyun et al., 1984).

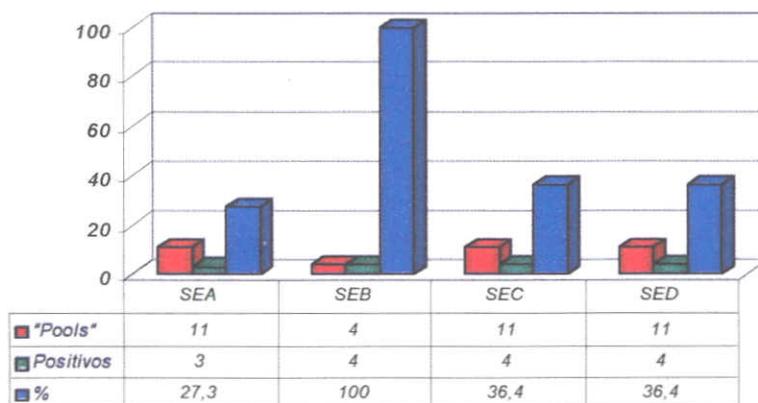


Figura 2.5. Detecção de enterotoxinas pelo método ELISA sanduíche a partir de cepas de *S. intermedius* isoladas de queijos coalhos comercializados em Recife-PE.

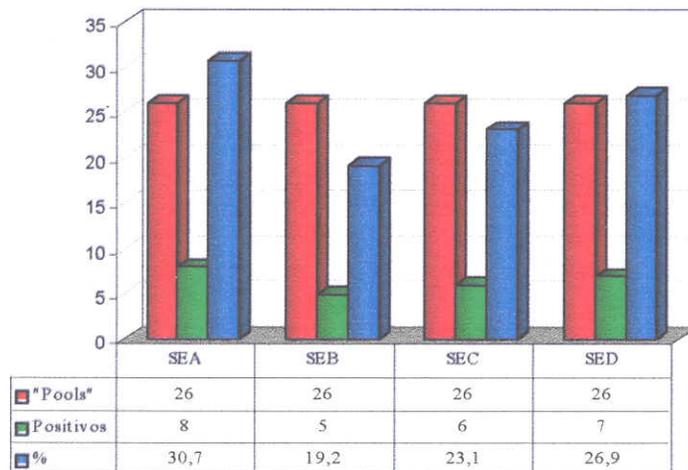


Figura 2.6. Detecção de enterotoxinas pelo método ELISA sanduíche a partir de cepas de *S. hyicus* isoladas de queijos coalho comercializados em Recife-PE.

Os pools testados apresentaram concentrações de enterotoxinas A,B,C e D variando entre 10 e 650 ng/mL , demonstrando assim a maior sensibilidade do método ELISA, considerando que o teste OSP atinge níveis de detecção próximos a 0,5 $\mu g/mL$, podendo ser detectado até 0,1 $\mu g/mL$, ao se fazer a concentração do sobrenadante (Robbins et al., 1974).

isoladas de queijo coalho comercializado em Recife-PE são potencialmente capazes de produzir enterotoxinas.

O consumo deste produto pode se constituir em risco a saúde pública.

As enterotoxinas mais freqüentemente detectadas foram a SEB e a SEC.

2.4. Conclusões

Cepas de *Staphylococcus* sp inclusive, *Staphylococcus* coagulase-negativa,

3. EXPERIMENTO III

Produção da toxina da síndrome do choque tóxico por *Staphylococcus aureus* isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE

Resumo

Este trabalho teve como objetivo verificar o potencial de produção da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE. Sessenta pools de cepas foram testados quanto ao potencial de produção da toxina, por indução em condições laboratoriais, pelo Método de Membrana sobre Ágar. Os extratos obtidos foram testados quanto a presença da toxina pelo método de sensibilidade ótima em placas utilizando toxina como padrão. Dos 60 pools testados, 21 (35 %) foram positivos. Estes resultados sugerem que o potencial para a produção de toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijos coalho pode representar sério risco à saúde pública.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, toxina da síndrome do choque tóxico, queijo coalho.

Summary

Production of toxic shock toxin syndrome by *Staphylococcus aureus* isolated from coalho cheese marketed in Recife-PE. The objective of this work was to investigate the potential for the formation of toxic shock toxin syndrome by *Staphylococcus aureus* strains isolated from coalho cheese marketed in Recife, Pernambuco, Brazil. Sixty pools of the strains were evaluated for the potential to produce the toxin, by induction under laboratory conditions using the membrane over agar method. The extracts obtained were tested for the presence of the toxin by the optimal sensibility in plates technique. From the 60 pools tested, 21 (35 %) were positive. This result suggests that the detected potential for formation of toxic shock toxin syndrome by *Staphylococcus aureus* strains isolated from coalho cheese

can represent serious health risks to "coalho cheese" consumers.

Key words: *Staphylococcus aureus*, toxic shock toxin syndrome, coalho cheese.

3.1. Introdução

A importância do *Staphylococcus aureus* sob o ponto de vista de saúde pública tem sido evidenciada por meio de levantamentos epidemiológicos relacionando-o às toxinfecções alimentares relatadas em todo o mundo (Genigeorgis, 1989).

Além das enterotoxinas, algumas cepas de *Staphylococcus aureus* produzem também outros metabólitos, entre eles, a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1). Esta toxina é um polipeptídeo de cadeia simples, apresentando peso molecular de 22.000 Daltons e ponto isoelétrico de 7,2. Os sintomas causados por esta toxina em humanos incluem febre, hipotensão, congestão em vários órgãos e choque letal (Bergdoll & Chesney, 1991). Segundo alguns autores, a TSST-1 tem várias propriedades biológicas em comum com outras exotoxinas pirogênicas, como por exemplo, capacidade de induzir febre, aumentar a letalidade do choque endotóxico, estimular a proliferação inespecífica de células T, induzir a produção de interleucina-1, gama interferon e fator alfa de necrose tumoral (Igarashi et al., 1986; Fast et al., 1988; Ikejima et al., 1988; Micusan et al., 1989; Ellis et al., 1993).

Jones & Wieneke (1986) relataram o primeiro caso de detecção de TSST-1 originária de *S. aureus* de origem animal isolados de casos severos de mastite bovina.

Vários autores estudaram a associação da TSST-1 com a produção de uma ou mais enterotoxinas produzidas por cepas envolvidas em casos de mastites. Matsunaga et al. (1993) descreveram que *S.*

aureus produtores de TSST-1 e enterotoxina estafilocócicas do tipo C estão relacionados com ocorrência de mastite clínica super aguda, possivelmente pela alta resposta inflamatória. Jones & Wieneke (1986), Morgan et al. (1986), Bogni et al. (1997) e Takeuchi et al. (1998) também observaram que a TSST-1 era produzida em associação com a enterotoxina tipo C. Em outro estudo, Kenny et al. (1992) testaram 262 cepas isoladas de leite e observaram que 20% destas eram produtoras de TSST-1 e de enterotoxina estafilocócica tipo D. Igarashi et al. (1986) isolaram 41 cepas de *S. aureus* de pacientes humanos e concluíram que 56% eram produtoras de TSST-1 e de enterotoxina estafilocócica tipo A. Cardoso (1999) observou que 47,2 % das cepas de *S. aureus* associadas a processo de mastite eram capazes de produzir de TSST-1. Estas também produziram enterotoxina estafilocócica dos tipos B (3,1 %) e D (13,4 %).

No Brasil, os estudos sobre a toxina da síndrome do choque tóxico são escassos. Considerando a importância desta toxina em saúde pública e a escassez de trabalhos científicos, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial de produção de toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijos coalho comercializados em Recife-PE.

3.2. Material e Métodos

Amostras de queijos coalho foram coletadas no período de janeiro a maio de 1997, em sete locais diferentes do comércio varejista de Recife - PE. As 107 amostras foram transportadas em embalagens plásticas sob refrigeração, por via aérea, e analisadas nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) em Belo Horizonte, MG. Dentre as cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas, 218 tiveram sua identificação confirmada por provas bioquímicas termonuclease, glicose (anaerobiose), manitol (anaerobiose e aerobiose), hemólise e catalase. As cepas foram agrupadas em 78 pools dos quais 60 foram testados quanto ao potencial de

produção da toxina da síndrome do choque tóxico.

A produção de toxina da síndrome do choque tóxico foi induzida em condições laboratoriais pelo Método de Membrana sobre Ágar (Hallander, 1965). Os sobrenadantes obtidos foram testados quanto a presença da toxina pelo Método de Sensibilidade Ótima em Placas (OSP). O antígeno e o anticorpo utilizados foram produzidos no Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da FUNED.

3.2.1. Indução da produção da toxina

A indução da produção de toxinas da síndrome do choque tóxico foi feita utilizando a técnica de membrana sobre ágar segundo metodologia descrita por Hallander (1965). Um pool de culturas jovens de *Staphylococcus aureus* com perfil bioquímico idêntico procedentes de uma mesma amostra de queijo foi obtido por incubação em caldo infusão cérebro-coração (BHI) durante 24 h a 37 °C. Placas de membrana sobre ágar foram preparadas com 20 mL de agar BHI, acrescido de 1% de extrato de levedura, recobertas com disco de membrana de diálise, inoculadas com 0,5 mL do inóculo do pool e incubadas a 37 °C por 24 h. As culturas obtidas foram lavadas com volumes de 1,5 e 1,0 mL de PBS 0,02 M, pH 7,4. O líquido da lavagem foi centrifugado sob refrigeração a 10.000 x g a 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante utilizado para averiguação de produção de toxina.

3.2.2. Detecção da toxina

Os extratos sobrenadantes, obtidos na etapa anterior foram submetidos ao método Sensibilidade Ótima em Placas (OSP) para investigar a presença de toxina da síndrome do choque tóxico conforme metodologia descrita por Robbins et al. (1974). Ágar Nobre fundido (3 mL) foi adicionado a placas de Petri de 50 x 12 mm. Uma vez solidificado, o ágar foi perfurado de forma a constituir sete orifícios, seguindo molde próprio segundo Food Research Institute. Antitoxina com titulação 1:24 foi colocada no

orifício central no volume de 50 µL e nos dois orifícios menores foi adicionada a toxina padrão na concentração de 4 µg/mL no volume de 25 µL. Alíquotas de 50 µL da amostra teste foram adicionadas aos quatro orifícios externos. As placas foram transferidas para uma câmara úmida e incubadas a 37 °C por 24 h. Reações positivas foram determinadas pela formação de linhas de precipitina entre as amostras e a toxina padrão.

3.3. Resultados e Discussão

Dos 60 pools de *Staphylococcus aureus* testados, 21 (35 %) foram positivos para a toxina da síndrome do choque tóxico, conforme indicado na Figura 3.1. Estes resultados são superiores àqueles obtidos por Cardoso (1999), que analisando amostras de leite cru proveniente de vários municípios do Estado de Minas Gerais, observou que das 127 cepas de *S. aureus* isoladas, 29 (23 %) eram produtoras de TSST-1. Entretanto, esses resultados são inferiores aos obtidos por Takeuchi et al. (1998) que, ao testarem 272 cepas de *S. aureus*, encontraram altas porcentagens de produtores de TSST-1: 76,7 % dos isolados de mastite subclínica, 58,1 % de mastite clínica e 75,4% isolados de leite estocado em tanques de expansão. Na literatura consultada não foram encontrados relatos de TSST-1 produzidas por cepas isoladas em queijos. Esse fato pode ser explicado

pela ausência de casos de intoxicação alimentar envolvendo a toxina ou qualquer outro distúrbio orgânico causado por ingestão oral da mesma. Porém são necessários estudos mais criteriosos em relação a presença desse metabólito em queijos uma vez que a literatura mostra uma alta frequência em leite proveniente de vacas com mastite assim como a alta letalidade em humano por ocasião da síndrome do choque tóxico.

Considerando as condições de obtenção do leite e de elaboração do queijo coalho em Pernambuco e a alta contaminação desses produtos por *S. aureus* enterotoxigênicos conforme descrito anteriormente no experimento II, a presença de TSST-1 nesse tipo de produto pode representar sério risco à saúde dos consumidores de queijos coalho nessa região do Brasil.

Apesar de ainda não haver trabalhos associando a ocorrência da síndrome do choque tóxico com o consumo de alimentos, seria importante investigar a possibilidade de transmissão desta síndrome via queijos coalho.

3.4. Conclusão

Staphylococcus aureus isolados de queijo coalho são capazes de produzir TSST-1, responsável pela síndrome do choque tóxico em humanos.

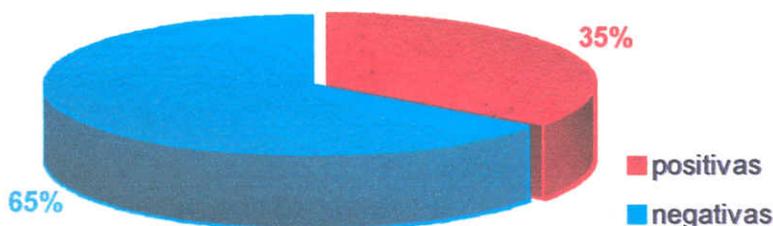


Figura 3.1. Produção de TSST-1 a partir de cepas de *S. aureus* isoladas de queijos coalho comercializados em Recife-PE.

4. EXPERIMENTO IV

Susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* sp isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE

Resumo

Cepas de *Staphylococcus* sp isoladas de amostras de queijos coalho comercializados em Recife - PE foram avaliadas quanto a resistência a antibióticos de uso comum em medicina humana e veterinária. *S. aureus*, *S. coagulase* - negativa, *S. intermedius* e *S. hyicus* apresentaram um percentual médio de 34,0; 28,4; 28,6 e 20,6 %, respectivamente, de resistência por doze diferentes antibióticos, dentre eles, penicilina G, eritromicina, vancomicina, cefaclor, novobiocina, oxacilina, gentamicina, ampicilina, kanamicina, rifampicina, estreptomicina e lincomicina. Maior resistência foi observada relativa à penicilina G (71,5 %), seguida da novobiocina (64,1 %) e da ampicilina (60,4 %). Menor resistência foi observada frente a gentamicina (0 %), seguida da vancomicina (3,8 %). As cepas de *S. hyicus* apresentaram uma resistência de 15% em relação a vancomicina.

Palavras chave: *Staphylococcus* sp , antibióticos, penicilina, gentamicina.

Summary

Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* sp isolated from coalho cheese marketed in Recife, Pernambuco, Brazil. *Staphylococcus* strains isolated from coalho cheese commercialized in Recife, Pernambuco, Brazil were evaluated with respect to resistance to antibiotics generally used for human and veterinary medicine. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. intermedius* and *S. hyicus* showed mean percent resistance of 34.0, 28.4, 28.6 and 20.6 % respectively, to twelve different antibiotics, among them, penicillin-G, erythromycin, vancomycin, cephaclor, novobiocin, oxacillin, gentamicin, ampicillin, kanamycin, rifampicin, streptomycin e lincomycin. Higher resistance was observed to penicillin (71.5 %), followed by novobiocin (64.1 %) and (ampicillin 60.4

%). Smaller resistance was observed for gentamicin (0 %), followed by vancomycin (3.8 %). This last one showed resistance only by 15 % of the *S. hyicus* strains investigated.

Key words: *Staphylococcus* sp, antibiotic, penicillin, gentamicin.

4.1. Introdução

Por mais de 45 anos, os antibióticos têm sido usados com sucesso no tratamento de doenças infecciosas no homem e nos animais. Entretanto, adicionalmente a sua utilização terapêutica, os antibióticos têm sido incluídos regularmente em rações animais como promotores de crescimento (De Aguayo et al., 1992). A principal consequência do amplo uso de antibióticos tem sido a emergência de amostras bacterianas resistentes (Levy, 1982). Patógenos resistentes a antibióticos em animais não somente preocupam devido a saúde animal mas também pela possível transmissão destes pela ingestão de alimentos contaminados (AMERICAN..., 1995).

Resistência a antibióticos resulta em morbidade e mortalidade por falhas de tratamento e em aumento dos custos com a saúde. Os custos atuais relatados para o tratamento de infecções por microrganismos resistentes a antibióticos são estimados pelo "National Center for Disease Control and Prevention" (CDC) em mais de 4 bilhões de dólares por ano. As resistências disseminam, envolvendo mais de um agente infeccioso, dificultando a eficácia do tratamento com drogas antimicrobianas. Uma preocupação crescente nos Estados Unidos e no mundo, refere-se ao impacto da resistência antimicrobiana nas indústrias produtoras de alimentos (Levy, 1982; AMERICAN..., 1995).

O leite de vaca tem sido considerado um valioso alimento para o homem, mas sua riqueza nutritiva o torna também um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de microrganismos, inclusive aqueles patogênicos para o homem (De Aguayo et al., 1992). Durante ou após a ordenha, estes microrganismos podem contaminar o leite, causando alterações inflamatórias na glândula mamária e/ou intoxicação alimentar no homem.

A importância do *Staphylococcus aureus* sob o ponto de vista de saúde pública tem sido evidenciada por meio de levantamentos epidemiológicos relacionando-o às toxinfecções alimentares relatadas em todo o mundo (Genigeorgis, 1989). A intoxicação estafilocócica é causada pela ingestão de enterotoxinas produzidas em alimentos por algumas espécies de *S. aureus* (Park et al., 1996). *Staphylococcus aureus* é a causa mais freqüente de mastite clínica e subclínica em vacas leiteiras na Inglaterra (Booth & Green, 1988; Mackie et al., 1988), assim como infecções por coliformes, embora não sejam frequentes os casos agudos e hiperagudos (Hill et al., 1984). Dos principais patógenos causadores de mastite, *S. aureus* é o mais difícil de ser tratado com antibióticos eficazmente, e taxas de falhas da terapia de 50 a 80% são comuns durante a lactação (Bramley & Dodd, 1984). Antibioticoterapia é usualmente a primeira escolha de tratamentos pelos veterinários. A escolha do antibiótico a ser usado pode ser obtida de amostras sensíveis a antibióticos por isolados de mastite contra uma variação de drogas antimicrobianas. Se um microrganismo patogênico é sensível a um antibiótico, a terapia pode não ser necessariamente um sucesso (Pearson & Mackie, 1979) mas, se o microrganismo é resistente, provavelmente o sucesso de tratamento é muito baixo (Davidson, 1980). Há muito tempo, vários pesquisadores têm demonstrado que a resistência pode aumentar com o uso de antibiótico na terapia de mastite (Wilson, 1961; Muckle et al., 1986).

Embora a maioria dos artigos científicos, anteriores a 1970, atribuissem alterações

patogênicas em animais ao *Staphylococcus aureus*, trabalhos mais recentes citam outras espécies, dentre elas, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. coagulase-negativa* como patógenos para animais (Gutierrez et al., 1990; De Aguayo et al., 1992; Muhammad et al., 1993; Khambaty et al., 1994). Espécies de *Staphylococcus coagulase-negativa* são mais freqüentemente isoladas de amostras assépticamente colhidas de leite bovino (Harmon & Langlois, 1989). Segundo Honkanen-Buzalski et al. (1994), a proporção de casos de mastite clínica devido a estes *Staphylococcus* tem aumentado durante a última década, mas as proporções de outros microrganismos como *S. aureus* e *Escherichia coli* tem apresentado poucas alterações.

Nos Estados Unidos, no período de 1983 a 1987, *Staphylococcus aureus* foi identificado entre os três principais agentes bacterianos causadores de surtos de origem alimentar (Bean et al., 1990; Bean & Griffin, 1990). Estes surtos, na maioria das vezes, estão associados com carnes processadas, produtos avícolas (especialmente salada de frango), molhos, produtos lácteos (especialmente queijos e pudins) e produtos de padaria (Dohnalek-Halpin & Marth, 1989).

Embora os dados na literatura brasileira (Santos et al., 1981; Carmo & Bergdoll, 1990; Cerqueira et al., 1994b) demonstrem a presença desse microrganismo em queijos fabricados artesanalmente em condições higiênico-sanitárias deficientes, as citações referentes a sua ocorrência em queijos coalho comercializados na região Nordeste do país são escassas (Santos et al., 1995), assim como o seu perfil de resistência a drogas antimicrobianas de uso comum em medicina humana e veterinária. Considerando o exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a resistência - sensibilidade, de diferentes espécies de *Staphylococcus* isoladas de queijos coalho comercializados em Recife-PE, à antibióticos de uso comum na medicina.

4.2. Material e Métodos

As cepas de *Staphylococcus* utilizadas neste experimento foram isoladas de 107 amostras de queijos tipo coalho coletadas no comércio varejista de Recife-PE, em sete locais diferentes, no período de janeiro a maio de 1997, conforme descrito anteriormente (experimento I).

As linhagens de *Staphylococcus* foram testadas quanto a resistência a diferentes antibióticos nas concentrações mais comumente utilizadas em medicina humana e veterinária: penicilina G (10 UI), vancomicina (30 µg), cefaclor (30 µg), eritromicina (15 µg), rifampicina (5 µg), estreptomicina (10 µg), lincomicina (2 µg), ampicilina (10 µg), kanamicina (30 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg) e novobiocina (5 µg).

A metodologia empregada baseou-se no método do disco único de alta concentração proposto por Bauer et al. (1966). A partir das culturas puras de *Staphylococcus aureus* (127), *S. coagulase-negativa* (43), *S. hyicus* (20) e *S. intermedius* (14), cinco colônias semelhantes foram selecionadas, inoculadas em 5 mL de caldo Müller-Hinton e incubadas por 2 a 8 horas em temperaturas de 35 a 37 °C, até atingir a turbidez padrão de 0,5 na escala de McFarland. Obtida a turbidez, o material foi semeado por meio de "swabs" em placas de

Petri medindo 14 cm de diâmetro e contendo 20 mL de ágar Müller-Hinton. A semeadura foi feita em eixos diferentes para uma completa uniformidade da placa. Após 5 minutos, os discos foram depositados sobre a placa a uma distância de 24 mm, de centro a centro. Após esse procedimento, as placas foram incubadas a 35 °C e a determinação do diâmetro dos halos de inibição foi efetuada após 24 horas, utilizando-se régua milimétrica (Ver Apêndice).

4.3. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos, conforme indicado na Figura 4.1, indicam que *S. aureus*, *S. coagulase-negativa*, *S. intermedius* e *S. hyicus* apresentaram resistência média variada aos doze diferentes antibióticos. De um modo geral, um maior percentual de cepas de *S. aureus* (32,3 %) e um menor de *S. intermedius* (26,3 %), foram resistentes aos antibióticos testados. Os resultados obtidos, conforme indicado na Figura 4.2 e Tabela 4.1, demonstram uma frequência elevada de cepas de *Staphylococcus sp* resistentes aos diferentes antibióticos. Estes dados são semelhantes àqueles obtidos por Swartz et al. (1984), Riedner et al. (1987), Mackie et al. (1988) e Refai et al. (1988) que também observaram um grande número de cepas de *Staphylococcus* isolados de leite proveniente de vacas, com mastite resistentes a antibióticos.

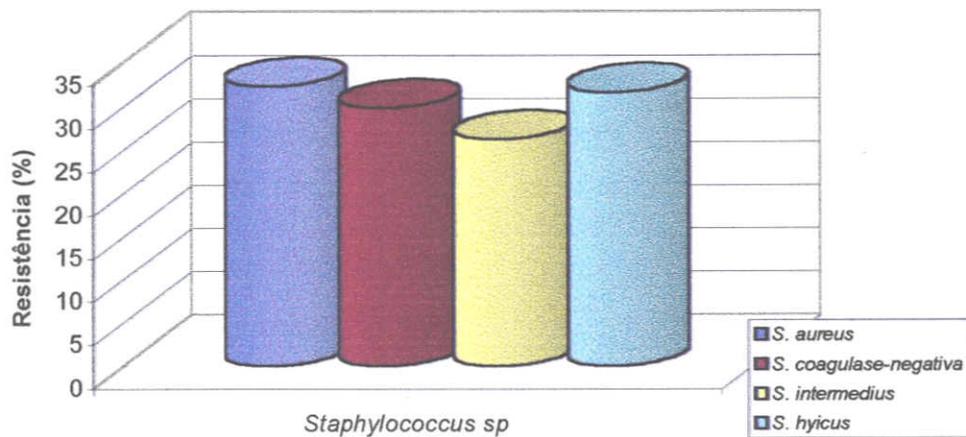


Figura 4.1. Percentual médio de cepas de *Staphylococcus* sp. resistentes a diferentes antibióticos.

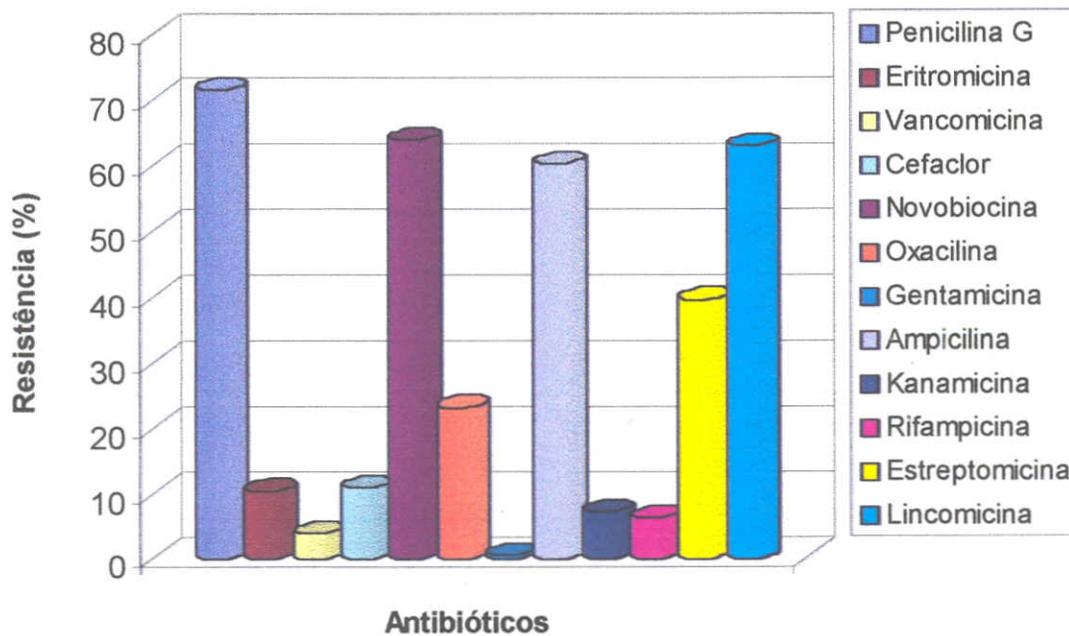


Figura 4.2. Resistência média de *S. aureus*, *S. coagulase-negativa*, *S. intermedius* e *S. hyicus* a doze diferentes antibióticos.

Tabela 4.1. Percentual de cepas de *S. aureus*, *S. coagulase-negativa*, *S. intermedius* e *S. hyicus* resistentes a doze antibióticos

Antibióticos (concentração)	Percentual (%) de cepas resistentes				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. coagulase-negativa</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. hyicus</i>	Média (%CV)
Penicilina G (10 UI)	87,4	74,4	64,3	60,0	71,5 (17)
Eritromicina (15 µg)	5,5	2,3	28,6	5,0	10,4 (118)
Vancomicina (30 µg)	0	0	0	15,0	3,8 (200)
Cefaclor (30 µg)	21,2	2,3	14,9	5,0	10,9 (81)
Novobiocina (5 µg)	57,5	76,7	57,1	65,0	64,1 (14)
Oxaciclina (1 µg)	45,7	41,9	0	5,0	23,2 (104)
Gentamicina (10 µg)	0	0	0	0	0,0 (0)
Ampicilina (10 µg)	72,4	53,5	85,7	30,0	60,4 (40)
Rifampicina (5 µg)	11,0	9,3	0	5,0	6,3 (78)
Estreptomocina (10 µg)	13,4	7,0	42,9	95,0	39,6 (101)
Lincomicina (2 µg)	57,5	86,0	14,3	95,0	63,2 (57)
Kanamicina (30 µg)	16,5	4,7	7,1	0	7,1 (98)
Média (% CV)	32,3 (94)	29,8 (105)	26,3 (113)	31,7 (108)	

Observou-se que um maior percentual de cepas foram resistentes à Penicilina G, com um valor médio de 71,5 % (Figura 4.1) e coeficiente de variação de 17 %. A maior resistência a Penicilina G foi observada para o *S. aureus* (87,4%). Esta maior resistência a penicilina G, pode ser explicada pela capacidade do *S. aureus* produzir beta-lactamase e pela possibilidade dos plasmídeos carregarem determinantes genéticos de resistência a drogas a outras espécies de *Staphylococcus* (Richmond, 1980). Este fato é importante porque estas espécies podem permanentemente alterar o perfil de sensibilidade a drogas usualmente empregadas no combate a infecções humanas e animais.

Alguns autores atribuem a alta resistência a antimicrobianos apresentada por determinadas cepas de *Staphylococcus* ao fato da transferência de resistência de uma linhagem a outra. Deste modo, Archer (1988) descreveu a capacidade de *S. epidermidis* ser um portador de gens de resistência a antibióticos e de transferi-los para o *S. aureus* em condições *in vitro* e *in*

vivo. Muhammad et al. (1993), no entanto, descrevem que informações sobre a transferência interespecífica de *Staphylococcus* isolados de glândula mamária bovina são extremamente limitadas. Além desses fatores, a exposição do microrganismo a um mesmo antibiótico por períodos prolongados também contribui para o aumento da resistência.

Os resultados obtidos neste estudo para a Penicilina G são semelhantes àqueles descritos por Panlilio (1992) para *S. aureus* e por Honkann-Buzalski et al. (1994) para *Staphylococcus coagulase-negativa*. Segundo Panlilio (1992), apesar de praticamente todas as amostras de *Staphylococcus aureus* serem sensíveis à penicilina quando este antibiótico foi introduzido em 1940, atualmente, mais de 90% das cepas deste microrganismo são resistentes a penicilina e outros antibióticos beta-lactâmicos.

Resistência elevada também foi observada para a novobiocina, variando de 57,1 % para o *S. intermedius* e 76,7 % para os *S.*

coagulase-negativa, com um valor médio de 64,1 % e um coeficiente de variação de 14,3 %.

Com relação à ampicilina, observou-se resistência total por cepas de *Staphylococcus* sp semelhante à obtida com a novobiocina. Entretanto, 85,7 % das cepas de *S. intermedius* e apenas 30% das de *S. hyicus* foram resistentes. De Aguayo et al. (1992), ao estudarem a resistência múltipla à antibióticos de microrganismos isolados de produtos lácteos comercializados no México, observaram resistência similar de *S. aureus* frente a ampicilina (80 %) quando comparado com os dados deste trabalho (72,4 %). *S. coagulase-negativa* apresentou 63% de resistência frente a ampicilina, enquanto que este estudo demonstrou uma frequência de 53,5 %, confirmando alta resistência a múltiplos antibióticos, de cepas deste microrganismo isoladas de alimentos.

Maior sensibilidade foi observada com relação a gentamicina e vancomicina, para as quais 0 e 3,8 %, respectivamente, das cepas testadas foram resistentes, isso pode estar relacionado ao fato desses antibióticos serem pouco utilizados para tratamentos de mastite bovina devido ao seu alto custo quando comparado com a penicilina por exemplo, desse modo o microrganismo não sendo exposto com frequência ao antibiótico apresenta uma maior sensibilidade. O aminoglicosídeo gentamicina, demonstrou, neste estudo, ser o antibiótico de maior efetividade a *Staphylococcus* sp isolados de queijos coalho. Buragohain & Dutta (1990), também observaram maior sensibilidade das cepas de *S. aureus* à gentamicina (94,7 %). No Brasil, Lange et al. (1996) testaram 100 cepas de *S. aureus* isoladas de inflamações intra-mamária e constataram uma sensibilidade de 100 % em relação a gentamicina. Entretanto, deve-se ressaltar que, embora este produto tenha

apresentado maior efetividade, o uso indiscriminado na terapia da mastite ou outras infecções, pode levar ao desenvolvimento de resistência, comprometendo a eficácia dos tratamentos.

Em relação aos antibióticos macrolídeos, as cepas estudadas apresentaram baixa resistência a eritromicina. Dados semelhantes foram observados por Buragohain & Dutta (1990), que observaram uma resistência similar por *S. aureus* (6,87 %).

Um aspecto importante refere-se a resistência de *S. intermedius* frente aos diversos antibióticos testados, demonstrando que mesmo esta espécie bacteriana, que não é frequentemente isolada de leite proveniente de vacas com mastite, logo supõe-se não estar exposta a ação múltipla de antibiótico, apresentou pouca sensibilidade às drogas usualmente empregadas na medicina humana e veterinária.

O alto nível de resistência múltipla a antibióticos representa um risco potencial para a saúde pública e pode dificultar o tratamento de doenças humanas e de animais, agravando quadros clínicos potencialmente curáveis.

4.4. Conclusão

Considerando os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que *Staphylococcus* sp isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE apresentam resistência múltipla a antibióticos comumente utilizados no tratamento de mastite bovina, sendo maior a resistência à penicilina e menor à gentamicina e vancomicina.

5. EXPERIMENTO V

Efeito inibitório da nisina e do sistema lactoperoxidase no crescimento de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos durante a produção de queijo frescal

Resumo

Os efeitos inibitórios de dois produtos à base de nisina e do sistema lactoperoxidase (LPS) foram avaliados sobre cepas enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* (PE-54) durante a produção de queijos frescal. Foram fabricados 70 queijos, utilizando, leite pasteurizado adicionado de coalho e cloreto de cálcio. Algumas amostras foram inoculadas com duas concentrações de *S. aureus* - 10^3 e 10^6 UFC/mL e adicionadas de nisina e LPS nas concentrações de 12,5 mg/kg e 200 mg/L, respectivamente. Os queijos fabricados foram armazenados a 10 e 30 °C por 48 horas. Os queijos foram analisados quanto a contagem de *S. aureus* e valores de pH. Diferenças significativas ($p > 0,05$) não foram observadas entre os resultados obtidos nos grupos experimentais e controle. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que nas condições utilizadas, os aditivos não inibiram o crescimento do *S. aureus*.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, nisina, sistema lactoperoxidase, queijo frescal.

Summary

Inhibitory effect of nisin and lactoperoxidase system on enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* growth during "frescal" cheese production. The inhibitory effect of two preservatives nisin and lactoperoxidase system (LPS) were evaluated on enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* (PE-54). Cheese samples were processed, using pasteurized milk, rennet and calcium chloride. Some samples were inoculated with 2 concentrations of *S. aureus* - 10^3 and 10^6 CFU/mL and in some, nisin and LPS were also incorporated at the

concentrations of 12.5 mg/kg and 200 mg/kg, respectively. The processed cheese samples were stored at 10 and 30 °C for 48 hours. Samples were analyzed for *S. aureus* and pH. Statistical difference ($p > 0,05$) was not observed among results, suggesting that under the conditions used in this experiment, growth of *S. aureus* was not inhibited by incorporation of nisin and LPS.

Key words: *Staphylococcus aureus*, nisin, lactoperoxidase system, "frescal" cheese.

5.1. Introdução

O envolvimento de microrganismos em surtos de toxinfecção alimentar é uma realidade que pode ser constatada por vários relatos, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno envolvido em toxinfecção alimentar (Eifert et al. 1996; Bergdoll, 1989; Carmo et al., 1994). O microrganismo está amplamente distribuído na natureza sendo a contagem média em leite cru no Brasil em torno de 10^5 UFC/mL, o que constitui em riscos de produção de enterotoxinas e desenvolvimento de intoxicação alimentar (Bergdoll, 1990). Ainda, segundo Bergdoll et al. (1989), o tipo mais comum de intoxicação alimentar resulta do crescimento de *Staphylococcus* sp produtores de enterotoxinas tipo A e B em alimentos. De fato, enteroxina estafilocócica tipo A está associada a 70 % dos casos confirmados de intoxicação alimentar causada por este microrganismo (Betley et al., 1984). O queijo é um dos produtos mais envolvidos em surtos de intoxicação estafilocócica no mundo (Bergdoll, 1989). Isto pode ser explicado pelo fato deste ser muito manipulado, além de outros agravantes como condições higiênico-sanitárias inadequadas em toda cadeia produtiva, principalmente em queijos elaborados de

forma artesanal e sem inspeção (Santos & Genigeorgis, 1981).

Segundo os resultados obtidos anteriormente (experimentos I e II), o queijo coalho apresentou contagens elevadas de *Staphylococcus* sp capazes, inclusive, de produzir enterotoxinas *in vitro*. Além disso, as cepas isoladas apresentaram resistência a vários antibióticos mais comumente utilizados na terapia da mastite bovina. O queijo coalho assim como outros queijos tipo frescal, amplamente produzidos e consumidos no Brasil apresentam em geral alta frequência de *Staphylococcus* sp podendo constituir em risco à saúde pública (Cerqueira et al. 1994b; Santos et al., 1995; Sena et al., 1998b). Assim sendo, alternativas viáveis para o controle da contaminação e proliferação destes microrganismos nesse produto são necessárias.

Além do controle da sanidade do gado leiteiro e da utilização de condições higiênico-sanitárias adequadas durante a ordenha, armazenamento e distribuição da matéria prima, ultimamente, tem sido uma preocupação constante de vários pesquisadores estudar simultaneamente, em diferentes níveis, alguns fatores capazes de afetar o crescimento de microrganismos durante a fabricação de queijos, tais como temperatura, pH, atividade de água, concentração de NaCl (Buchanan & Phillips, 1990; Buchanan, 1993), uso de aditivos como sorbato de sódio (Lahellec et al., 1981; Narasimhan et al., 1989), nisina (Davies et al., 1997), lisozima (Lodi, 1990) e o sistema lactoperoxidase (Kamau et al., 1990). Alguns microrganismos freqüentemente encontrados em queijos têm sido testados frente a estes fatores, podendo ser destacados a *Listeria monocytogenes* e o *Staphylococcus aureus* (Kamau et al., 1990; Davies et al., 1997).

Adicionalmente, o controle e prevenção da contaminação e proliferação de *Staphylococcus* sp ao nível tecnológico e industrial seria uma alternativa viável de garantir a qualidade higiênico-sanitária do queijo. Alguns aditivos, classificados como conservantes, foram recentemente

aprovados pela legislação brasileira, a fim de minimizar o crescimento de patógenos em alimentos, inclusive leite destinado a fabricação de queijos. Segundo a Portaria nº 146, publicada no Diário Oficial de 11 de março de 1996 (Brasil, 1996), são permitidas as adições de ácido sórbico e seus sais (Na, K e Ca), nisina, lisozima, nitrato de sódio ou potássio e natamicina em leite destinados a fabricação de queijos. Um produto a base de nisina teve seu uso liberado pelo Ministério da Agricultura para ser adicionado como conservante em leites destinados a fabricação de queijos, segundo ofício do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal N° 196/98 publicado em 30/04/98 (Brasil, 1998).

Um outro produto cujo princípio ativo é o sistema lactoperoxidase foi aprovado pelo Ministério da Agricultura no ofício 0122/97 do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, publicado em 24/06/1997 (Brasil, 1997a), para ser adicionado como conservante em alimentos processados inclusive derivados de leite. Este produto foi registrado no Ministério da Saúde segundo a Portaria nº 161 publicada no dia 28 de abril de 1997.

Dentre estes conservantes permitidos recentemente pela legislação brasileira, a nisina e o sistema lactoperoxidase apresentam características que os tornam mais fáceis de serem aceitos, como o fato de serem naturais e de já estarem sendo utilizados amplamente em outros países (Sarkar & Mitra, 1994; Turtell & Delves-Broughton, 1998).

A nisina é um polipeptídeo antibacteriano produzido por determinadas cepas de *Lactococcus lactis* subespécie *lactis*, inicialmente conhecido como *Streptococcus lactis*. Este polipeptídeo apresenta atividade antimicrobiana contra várias bactérias Gram positivas, particularmente formas esporuladas termorresistentes (Delves-Broughton, 1998). O primeiro relato da possível ação da nisina foi feito por Rogers & Whittier (1928), com o objetivo de inibir bactérias ácido lácticas. Em 1947, pesquisas reconheceram que esse polipeptídeo era produzido por certas cepas de

Streptococcus, do grupo N, dando a origem ao nome nisina (Hirsch et al., 1951). Uma vez que o processo de pasteurização destrói principalmente as bactérias Gram negativas, leveduras e fungos, recomenda-se o uso da nisina para inibir as bactérias Gram positivas que sobrevivem ao processo de pasteurização. A nisina tem sido utilizada em leite e produtos lácteos, produtos a base de ovos, vegetais, vinhos e cervejas (Hurst, 1983).

O sistema lactoperoxidase (LPS) é uma combinação da enzima lactoperoxidase (LP), tiocianato (SCN⁻) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Este procura imitar o sistema naturalmente presente no leite cru, que consiste na ação catalizadora da enzima lactoperoxidase sobre a oxidação do tiocianato pelo peróxido de hidrogênio resultando na formação de íons de hipotiocianato, responsáveis pelo efeito antimicrobiano do LPS (Reiter, 1985). Esse sistema é bacteriostático para microrganismos Gram positivos e bactericida para Gram negativos (Reiter & Hamulv, 1984). Entretanto, segundo Wolfson & Sumner (1993), diferentes grupos de bactérias apresentam grau variado de resistência. A ação do sistema depende do pH do meio, da temperatura, do tempo de incubação e da densidade celular. O efeito bactericida do LPS é verificado em pH baixo ($\leq 5,0$), em baixas temperaturas e na ausência de agentes redutores (Pruitt & Reiter, 1985). Este mecanismo de ação possibilita o aumento do tempo de estocagem do leite cru controlando também o crescimento de bactérias psicotróficas.

Embora estes conservantes tenham sido aprovados no Brasil para uso em produtos lácteos, não há dados disponíveis sobre a eficiência dos mesmos na literatura brasileira. Uma das dúvidas sobre a sua eficácia reside no fato destes produtos serem recomendados para matéria-prima com baixas contagens microbianas. Como a contagem microbiana média do leite no país é em torno de 10⁶ UFC/mL (Brandão, 1998), ou seja, uma alta carga microbiana, a eficiência destes conservantes pode ser comprometida. Considerando apenas este aspecto, a simples recomendação destes

conservantes, não isenta os queijos de causarem quadros de intoxicação alimentar. Desta forma, verifica-se a necessidade de avaliar a eficiência destes produtos frente a estirpes brasileiras enterotoxigênicas isoladas de queijos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência dos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase na inibição do crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* (isoladas de queijo coalho fabricado artesanalmente no Estado de Pernambuco e comercializado em Recife) durante a produção de queijo tipo frescal.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Material

Para a fabricação dos queijos foram utilizados um total de 140 litros de leite, obtido de vacas pertencentes ao rebanho leiteiro da Fazenda Experimental da UFMG, localizada no município de Pedro Leopoldo, MG, sendo as mesmas negativas ao California Mastitis Test (CMT). O leite destinado a elaboração dos queijos foi obtido de um lote de vacas pertencentes ao rebanho leiteiro da Fazenda Experimental da UFMG. Este lote, durante três meses não recebeu tratamento com antibiótico ou carrapaticida. A medida que uma vaca mostrava-se positiva para mastite pelo CMT, a mesma era descartada do lote, assim sendo um lote que era inicialmente constituído de 29 vacas, chegou ao final do experimento com 12 animais.

O leite foi ordenhado pela manhã sob rigoroso controle higiênico, e imediatamente encaminhado à Planta Piloto de Laticínios do Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC) para a fabricação dos queijos, a qual se procedeu conforme descrito na Figura 5.1.

5.2.2. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado segundo metodologia descrita por Anunciação et al. (1994). Uma cultura jovem foi obtida por

meio de crescimento em caldo infuso de cérebro coração (BHI) incubado a 37 °C por 24 horas, repicada na superfície de Ágar Tripton de Soja (TSA) e novamente incubada a 37 °C por 24 horas. Um volume (7 mL) de água peptonada tamponada foi adicionado ao tubo, sendo o crescimento raspado e homogeneizado. A partir desse tubo foram feitas diluições decimais até 10^{-10} , as quais foram plaqueadas em Ágar Baird-Parker e incubadas a 37 °C por 48 horas. Foram então efetuadas as contagens e calculado o volume do inóculo a ser adicionado ao leite (4000 mL) de forma a se obter contagens de 10^2 e 10^3 UFC/mL. Para contagem de 10^2 UFC/mL foram utilizados 0,5 mL da diluição de 10^{-5} /litro de leite, totalizando 2 mL para os 4 litros utilizados em cada tratamento. Para contagem de 10^3 UFC/mL foram calculados 3,7 mL da diluição de 10^{-2} / litro de leite, totalizando 14,8 mL para os 4 litros utilizados por tratamento. Após 30 e 50 minutos de incubação, essas contagens atingiram 10^3 e 10^6 UFC/mL, respectivamente.

5.2.3. Fabricação dos queijos

A fabricação dos queijos procedeu-se conforme indicado na Figura 5.1. O leite foi submetido à pasteurização lenta (65 °C por 30 minutos) em tanque de camisa dupla e rapidamente resfriado a 32 - 35 °C. Para a

fabricação dos queijos foram utilizadas cubas plásticas identificadas com os respectivos tratamentos. Quatro litros de leite foram adicionados em cada cuba e, em seguida, adicionada dos inóculos de forma a se obter contagens de 10^3 e 10^6 UFC/g, como descrito anteriormente. Logo em seguida, foram adicionados os conservantes LPS, na quantidade, máxima recomendada pelo fabricante, de 200 mg/L de leite ou Nisina, na quantidade, permitida pela legislação, de 12,5 mg/kg de queijo. Foram também adicionados cloreto de cálcio e o coalho nas concentrações de 20 g/100 mL de leite e 1 mL/L de leite respectivamente. Em 42 a 45 minutos, confirmada a coagulação do leite, procedeu-se o corte da massa e as etapas subsequentes. Foram então obtidos sete grupos com a composição descrita na Tabela 5.1. Para cada grupo foram fabricados dois queijos de 0,250 kg, sendo um estocado a temperatura de 10 e o outro a 30 °C (temperatura ambiente média anual do Estado de Pernambuco) durante 48 horas. O processamento completo foi efetuado em cinco dias distintos (quintuplicata). Após a elaboração dos queijos o soro foi recolhido e autoclavado. Tanto os tanques como todos os utensílios utilizados no processamento passaram por uma rigorosa sanitização com solução clorada.

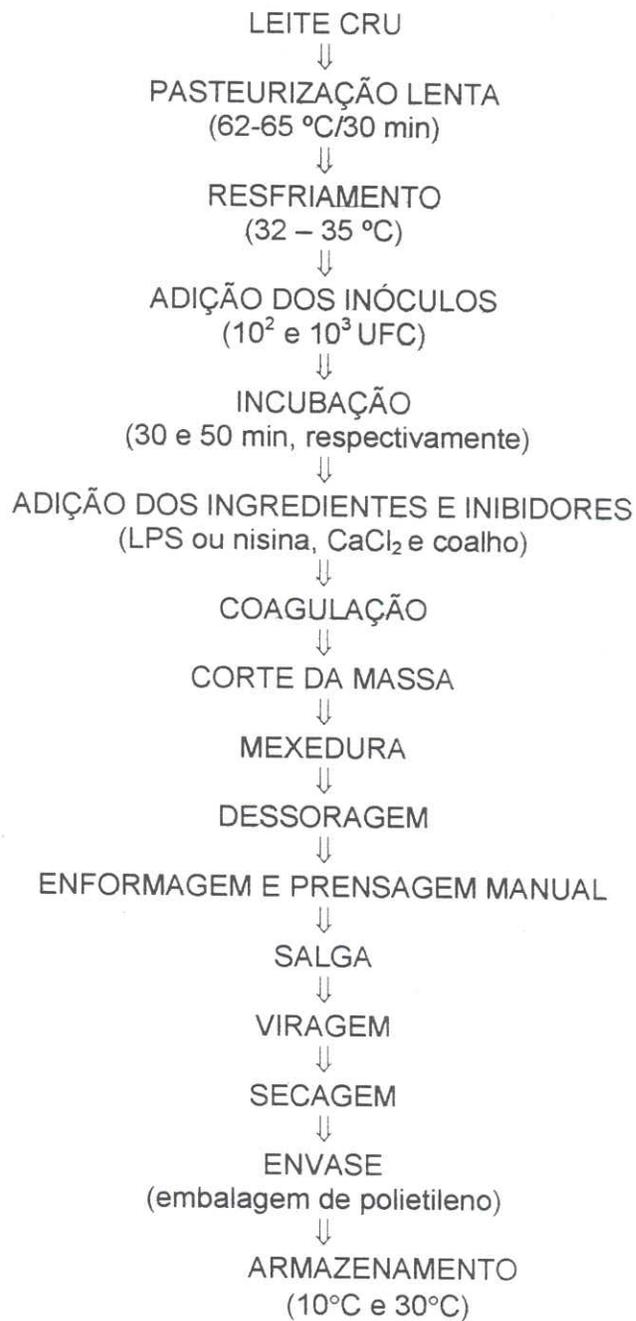


Figura 5.1. Fluxograma de fabricação dos queijos.

Tabela 5.1. Ingredientes utilizados na elaboração dos diferentes grupos de queijo fresco

Tratamentos	Ingredientes						
	Leite	CaCl ₂	Coalho	Contagem		Conservante*	
				<i>S. aureus</i> (PE-54)		Nisina	LPS
			10 ³	10 ⁶			
1				-	-	-	-
2				-	-	-	-
3				-	-	-	-
4				-	-	-	-
5				-	-	-	-
6				-	-	-	-
7				-	-	-	-

* Os conservantes nisina e sistema lactoperoxidase foram utilizados nas concentrações de 200 mg/L e 12,5 mg/kg, respectivamente.

5.2.4. Métodos de análise

Amostras de leite antes e após a pasteurização foram encaminhadas aos Laboratórios de Físico-Química do DTIPOA da Escola de Veterinária da UFMG e para o Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), onde foram feitas as análises físico-químicas bioquímicas, respectivamente. As análises físico-químicas incluíram acidez titulável, álcool alizarol, pesquisa das enzimas fosfatase alcalina e peroxidase (Brasil, 1981). O leite também foi avaliado quanto ao conteúdo de células somáticas (CCS) pelo método "Wisconsin Mastitis Test". Foi também realizada pesquisa de inibidores (TTC) segundo metodologia descrita por Magalhães (1995), visando controlar a qualidade do leite e preservar a integridade dos resultados do experimento.

As análises microbiológicas do leite incluíram: (i) isolamento e determinação quantitativa de *Staphylococcus* sp de acordo com metodologia proposta por Lancette & Tatini (1992); (ii) número mais provável (NMP) de coliformes, pesquisa de microrganismos mesofílicos e psicrotróficos aeróbios (Brasil, 1992).

As amostras de queijo foram analisadas após 48 horas de armazenamento, no Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas

da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), as análises processadas constaram de isolamento e determinação quantitativa de *Staphylococcus aureus* de acordo com metodologia proposta por Lancette & Tatini (1992), assim como a determinação de pH (Brasil, 1992).

5.2.5. Análise estatística

Os resultados quantitativos discretos (contagens) não apresentaram distribuição normal mesmo após a transformação logarítmica, razão pela qual foram submetidos a uma análise não paramétrica de Kruskal-Wallis com as ordenações médias comparadas pelo teste T de Student (Sampaio, 1998). Os dados quantitativos (pH) foram submetidos a análises de variância seguindo delineamento inteiramente casualizado com os tratamentos em esquema fatorial 2 x 7 (2 temperaturas e 7 condições com 5 repetições). As médias foram comparadas pelo teste de Duncan.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Controle físico-químico, bioquímico e microbiológico do leite cru e pasteurizado

As amostras de leite cru apresentaram ausência de floculação, indicando pH normal e resistência ao aquecimento. Da mesma forma, a acidez titulável média foi de 14,5 °D. Após a pasteurização, observou-se valor médio de acidez de 14 °D, demonstrando que não houve alteração de acidez do leite durante o tratamento térmico.

O resultado médio observado para a contagem de célula somática foi de 3 mm, correspondendo a 140.000 células somáticas (CCS/mL de leite), indicando tratar-se de um leite apto para produção de queijos, sem provável comprometimento do rendimento industrial. Foi também observada ausência de inibidores em todas as amostras de leite, uma vez que o teste TTC foi positivo.

Os resultados obtidos em todas as amostras de leite cru, quanto à pesquisa das enzimas fosfatase alcalina e lactoperoxidase foram positivos, demonstrando a presença e atividades destas enzimas. Os resultados

com leite pasteurizado comprovaram que o leite foi apropriadamente aquecido em binômio temperatura-tempo suficiente para inativar a fosfatase alcalina, e não a lactoperoxidase.

As análises microbiológicas do leite cru e do leite pasteurizado indicaram ausência de *Staphylococcus aureus* em 25 mL de amostra, baixos valores para coliformes totais e fecais (NMP/mL), e baixas contagens de microrganismos mesófilicos e psicrotróficos aeróbios, conforme descrito na Tabela 5.2 e no Apêndice. Esses resultados demonstraram que as condições higiênico-sanitárias de ordenha foram eficientes e que o acondicionamento do leite cru foi apropriado. Com relação ao leite pasteurizado e os queijos processados, não foi verificada contaminação durante ou pós-processamento, demonstrando que estes produtos foram higienicamente manipulados.

Tabela 5.2. Resultados médios de análises microbiológicas de amostras de leite cru e pasteurizado

Análises	Tipos de leite	
	Cru	Pasteurizado
<i>Staphylococcus aureus</i> (25 mL de amostra)	Ausência	Ausência
Contagem de microrganismos mesofílicos aeróbios (UFC/mL)	< 2,0 x 10 ²	< 2,0 x 10 ⁰
Contagem de microrganismos psicrotróficos (UFC/mL)	< 2,0 x 10 ²	< 2,0 x 10 ⁰
Pesquisa de coliformes totais (NMP/mL)	< 0,3	< 0,3
Pesquisa de coliformes fecais (NMP/mL)	< 0,3	< 0,3

5.3. 2. Qualidade dos queijos

Os valores médios de pH dos queijos obtidos em cada um dos sete tratamentos estão descritos na Tabela 5.3 e no Apêndice. Observou-se que menores

valores ($p < 0,05$) foram encontrados em queijos incubados a 30 °C comparado a 10 °C. Esse fato ocorreu independente da concentração do inóculo de *Staphylococcus aureus*, bem como da presença ou ausência dos inibidores LPS ou nisina.

Tabela 5.3. Valores médios do pH de queijos frescal fabricados com leite inoculado com *S. aureus* e adicionado dos conservantes LPS ou nisina e armazenados a 10 ou 30 °C por 48 horas

Tratamentos:	pH de amostras incubas a *	
	10 °C	30 °C
leite + CaCl ₂ + coalho +		
1 (controle negativo)	6,98 ^{aA}	5,88 ^{aB}
2 10 ³ <i>S. aureus</i>	7,10 ^{aA}	5,88 ^{aB}
3 10 ⁶ <i>S. aureus</i>	6,98 ^{aA}	5,90 ^{aB}
4 10 ³ <i>S. aureus</i> + LPS	7,06 ^{aA}	5,92 ^{aB}
5 10 ⁶ <i>S. aureus</i> + LPS	6,96 ^{aA}	5,98 ^{aB}
6 10 ³ <i>S. aureus</i> + nisina	6,96 ^{aA}	6,04 ^{aB}
7 10 ⁶ <i>S. aureus</i> + nisina	6,92 ^{aA}	6,18 ^{aB}

*Letras minúsculas iguais nas colunas indicam tratamentos equivalentes e letras maiúsculas iguais nas linhas indicam efeito de temperatura equivalente.

Esta diferença observada no pH, com valores mais baixos nos queijos incubados a 30 °C pode ter ocorrido devido a conversão da lactose em ácido láctico pelo processo de fermentação, por microrganismos acidificantes termoestáveis, que poderiam ter sobrevivido à pasteurização. Essas bactérias tem melhor crescimento à 30 °C em relação à 10 °C, pois sua temperatura ótima de desenvolvimento está entre 30 a 45 °C.

Os resultados obtidos com relação a contagem de *Staphylococcus aureus* nos queijos submetidos aos diferentes tratamentos estão descritos na Tabela 5.4 e no Apêndice. Observa-se que, no tratamento controle não houve crescimento de *S. aureus*, confirmando que o controle do rebanho e a manipulação durante o processo de ordenha foram eficientes para garantir a ausência de *S. aureus* nos queijos, e que não houve contaminação do queijo por este microrganismo durante sua fabricação e armazenamento.

Tanto para as amostras armazenadas a 10 como a 30 °C, os tratamentos 3, 5 e 7, ou seja aquelas em que o leite foi inoculado com 10⁶ UFC/mL, apresentaram resultados médios mais elevados ($p < 0,05$) do que os obtidos nos tratamentos 2, 4 e 6 (leite inoculado com 10³ UFC/mL). Assim sendo, conclui-se que, quando o inóculo foi maior, a recuperação do microrganismo nos queijos também foi maior, independente das demais variáveis.

Observa-se que menores contagens observadas nos grupos incubados a 10 comparado a 30 °C. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Tatini et al. (1973) e associados às características do *S. aureus*, que apresenta melhor crescimento em faixas de temperatura de 7 a 47°C, com temperatura ótima de 37°C.

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) na contagem de *S. aureus* entre os tratamentos 3, 5 e 7 para ambas as temperaturas. Estes resultados indicam que não houve efeito inibitório dos conservantes adicionados, LPS (tratamentos 5) ou nisina

(tratamentos 7) sobre o desenvolvimento do *S. aureus* quando comparados com os tratamentos 3 (grupos controles inoculados com *S. aureus* a 10^6 UFC/mL). O mesmo

ocorreu para as amostras submetidas aos tratamentos 2, 4 e 6; ou seja, controle positivo, adição de LPS e de nisina, respectivamente.

Tabela 5.4. Contagem média de *S. aureus* isolados de queijos frescal fabricados com leite adicionado dos conservantes LPS ou nisina e armazenados a 10 ou 30 °C por 48 horas

Tratamentos:	<i>S. aureus</i> (\log_{10} UFC/g) nas amostras incubas a	
	10 °C	30 °C
leite + CaCl ₂ + coalho +		
1 (controle negativo)	A 0 ^c	A 0 ^c
2 10^3 <i>S. aureus</i>	B 5,02 ^b	A 7,94 ^b
3 10^6 <i>S. aureus</i>	B 9,18 ^a	A 9,56 ^a
4 10^3 <i>S. aureus</i> + LPS	B 5,20 ^b	A 8,21 ^b
5 10^6 <i>S. aureus</i> + LPS	B 8,53 ^a	A 9,49 ^a
6 10^3 <i>S. aureus</i> + nisina	B 5,55 ^b	A 8,06 ^b
7 10^6 <i>S. aureus</i> + nisina	B 8,54 ^a	A 9,58 ^a

*Letras minúsculas iguais nas colunas indicam tratamentos equivalentes.

*Letras maiúsculas iguais nas linhas indicam efeito de temperatura equivalente.

No caso da lactoperoxidase, a ineficiência na inibição do crescimento de *S. aureus*, pode estar associada ao elevado valor médio de pH observado ou seja 5,96 a 30 °C e 6,99 a 10 °C. Segundo Pruit & Reiter (1985), os efeitos antimicrobianos do sistema lactoperoxidase dependem, dentre outros fatores, da temperatura e pH do produto, sendo mais eficiente de 0 a 5 °C e em valores de pH \leq 5. Estes dados, entretanto, são contraditórios àqueles publicados em informativo técnico dos fabricantes, que garantem eficiência mesmo em faixa de pH variando de 3,6 a 8,3.

Com relação à concentração do inóculo de *S. aureus*, verifica-se que mesmo quando o produto foi exposto a uma menor concentração - 10^3 UFC/mL, limite máximo permitido pela legislação brasileira (Brasil, 1996) para queijos de alta umidade, o LPS não foi eficiente. Considerando que o leite

produzido no Brasil, apresenta de um modo geral, elevada contaminação, inclusive por este microrganismo, a utilização deste inibidor, não irá garantir a inocuidade do queijo obtido.

Com relação a nisina, verifica-se também a ausência de eficácia do tratamento na inibição do crescimento de *S. aureus*. Isto pode ser devido ao valor do pH dos queijos. Apesar dos dados da literatura (Delves-Broughton, 1998), serem conflitantes com aqueles descritos pelos fabricantes (EL QUESO..., 1996), os quais descrevem pH ótimo de atuação como sendo 2,0 e 5,4, respectivamente, na faixa de pH estudada, não teria sido observado efeito significativo. Um outro fator que pode ter afetado a eficiência da nisina neste estudo seria a concentração utilizada. A concentração do produto aprovada pelo Ministério da Agricultura (12,5 mg/Kg), e utilizada neste

experimento é bem inferior àquele recomendada pelo fabricante para fabricação de queijos, ou seja, de 200 a 600 mg/Kg. Além disto, outro aspecto importante refere-se à possível perda durante o processamento, principalmente no soro. Desta forma, a concentração remanescente no alimento, pode não ter sido eficiente para evitar a proliferação de *S. aureus*, independentemente da temperatura de armazenamento dos queijos (10 e 30 °C).

5.4. Conclusão

Os conservantes lactoperoxidase e nisina nas concentrações utilizadas não foram efetivos na inibição do crescimento de *S. aureus* a uma concentração inicial de 10^3 e 10^6 UFC/g durante a fabricação e armazenamento de queijos frescos a 10 e 30°C por 48 h.

3 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

Queijos coalho comercializados em Recife-PE apresentam alta contaminação por *Staphylococcus* sp.

A identificação de espécies como *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. coagulase-negativa* e *S. hyicus* sugerem contaminação do leite e/ou do queijo a partir do homem e dos animais.

As cepas de *Staphylococcus* sp isoladas dos queijos coalho apresentam-se capazes de produzir enterotoxinas *in vitro*.

As enterotoxinas mais freqüentemente produzidas pelas cepas de *Staphylococcus* sp isoladas dos queijos coalho foram a SEB e a SEC.

O consumo deste produto, comercializado em temperatura ambiente pode se constituir em risco a saúde pública.

Queijos coalho comercializados em Recife-PE, apresentam contaminação por *Staphylococcus* coagulase-negativa

enterotoxigênicos, potencialmente capazes de causar intoxicação alimentar.

Staphylococcus aureus isolados de queijos coalho foram capazes de produzir toxina TSST-1, responsável pela síndrome do choque tóxico.

Staphylococcus sp isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE apresentam resistência múltipla a antibióticos. A gentamicina mostrou ser o antibiótico mais eficiente para as cepas de *Staphylococcus* sp isoladas dos queijos coalho.

Os conservantes lactoperoxidase e nisina nas concentrações utilizadas não foram efetivos na inibição do crescimento de *S. aureus* a uma concentração inicial de 10^3 e 10^6 UFC/g durante a fabricação e armazenamento de queijos frescos a 10 e 30°C por 48 h.

Com o exposto, pesquisas adicionais em relação a presença de enterotoxinas em extratos do queijo deve ser investigadas;

Bioensaios devem ser realizados visando investigar o possível envolvimento da TSST-1 em surtos de intoxicação alimentar quando ingerida;

Em relação aos produtos comerciais utilizados, pesquisas devem ser efetuadas no sentido de se determinar as concentrações reais em que devem ser utilizadas para que os mesmos sejam efetivos em produtos com cargas microbianas acima de 10^3 UFC/g/mL;

Trabalhos de extensão rural envolvendo órgãos públicos como Universidades, Secretarias de Saúde do Estado e Municípios, Secretária da Agricultura, Ministério da Agricultura e outros devem ser realizados no sentido de orientar o produtor e monitorar a produção de queijos coalho no Estado;

Considerando estes aspectos, torna-se necessário, a implantação de políticas visando monitorar a produção de queijos coalho no Estado de Pernambuco. Essa

política deve ser fundamentada principalmente em programas que incentivem a produção formal do queijo coalho uma vez que praticamente toda produção do Estado é realizada informalmente.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESIYUN, A.A., TATINI, S.R., HOOVER, D.G. Production of enterotoxins by *Staphylococcus hyicus*. **Vet. Microbiol.** v.9, n.5, p.487-495, 1984.
- ALI-VEHMAS, T., WESTPHALEN, P., MYLLYS, V. et al. Binding of *Staphylococcus aureus* to milk fat globules increases resistance to penicillin G. **J. Dairy Res.** v.64, n.2, p.253-260, 1997.
- AMERICAN Society for Microbiology Report of the ASM task force on antibiotic resistance supplement to antimicrobial agents and chemotherapy. **Am. Soc. Microbiol.** v.39, n.6, p.2-23, 1995.
- ANDERSON, J.C. Veterinary aspects of staphylococci. In: EASMON, C.S.F., ADLAM, C. (eds). **Staphylococci and staphylococcal infections**. London: Academic Press, 1983. v.1, p.193-241.
- ANUNCIAÇÃO, L.L.C., LINARDI, W.R., CARMO, L.S. et al. Production of staphylococcal enterotoxin A in cream-filled cake. **Int. Food Microbiol.** v.26, p.259-263, 1994.
- ARAÚJO, W.P. *Staphylococcus aureus* em leite cru. Produção de enterotoxina, caracterização da origem provável, humana ou bovina, à partir das cepas isoladas. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 1984. 127p. Tese (Livre Docência).
- ARCHER, L. Molecular epidemiology of multiresistant *Staphylococcus epidermidis*. **J. Antimicrob. Chemother.** v.21 (Suppl C), p.133-138, 1988.
- ASPERGER, H. *Staphylococcus aureus*. In: Significance of pathogenic microorganisms in raw milk. **Int. Dairy Fed.** p.24-42, 1994.
- BAIRD-PARK, A.C. The Staphylococci: an introduction. **J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.** 19, v.70, n.1, 1S-8S, 1990.
- BAUER, A.W., KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.
- BAUTISTA, L., GAYA, P., MEDINA, M. et al. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk Staphylococci. **Appl. Environ. Microbiol.** v.54, n.2, p.4799-4806, 1988.
- BEAN, N.H., GRIFFIN, P.M. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987 pathogens, vehicles and trends. **J. Food Protect.** v.53, n.9, p.804-817, 1990.
- BEAN, N.H., GRIFFIN, P.M., GOULDING, J.S. et al. Foodborne disease outbreaks, 5-year summary, 1983-1987. **J. Food Protect.** v.53, n.8, p.711-728, 1990.
- BENNETT, R.W. A typical toxigenic staphylococcus and non-*Staphylococcus aureus* species on the horizon? an update. **J. Food Protect.** v.59, n.10, p.1123-1126, 1996.
- BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Food Microbiol.** v.10, p.91-100, 1990.
- BERGDOLL, M.S. Importance of Staphylococci that produce nanogram quantities of enterotoxin. **Zentr. für Bakteriologie.** v.282, p.1-6, 1995.
- BERGDOLL, M.S. Staphylococcal intoxications. In: REIMANN, H., BRYAN, F.L. **Foodborne Infections and Intoxications**. New York: Academic Press, Inc, 1979, p.443-494.
- BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989, p.463-523.

- BERGDOLL, M.S., BORJA, C.R., AVENA, R.M. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. **J. Bacteriol.** v.90, n.5, p.1481-1485, 1965.
- BERGDOLL, M.S., BORJA, C.R., ROBBINS, R.N. et al. Identification of enterotoxin E. **Infect. Immunity** v.4, n.5, p.593-595, 1971.
- BERGDOLL, M.S., CHESNEY, P.J. **Toxic Shock Syndrome.** Boston: CRC Press, 1991, 235 p.
- BERGDOLL, M.S., SURGALLA, M.J., DACK, G.M. Staphylococcal enterotoxin. Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property. **J. Immunol.** v.83, n.2, p.334-338, 1959.
- BETLEY, M.J., LOFDAHL, S., KREISWIRT, B.N. et al. Staphylococcal enterotoxin A gene is associated with a variable genetic element. **Proceed. Nat. Acad. Sci.** n.81, p.51-79, 1984.
- BHATTI, A.R., SIDDIQUI, Y.M., MICUSAN, V.V. Highly sensitive fluorogenic enzyme-linked immunosorbent assay: detection of staphylococcal enterotoxin. **J. Microbiol. Meth.** v.19, p.179-187, 1994.
- BLAIR, J.E., WILLIAMS, R.E.O. Phase typing of staphylococci. **Bull. World Health Org.** v.56, p.2471-2484, 1961.
- BLOSSER, T.H. Economic losses from mastitis and the National Research Program on mastitis in the United States. **J. Dairy Sci.** v.62, p.127, 1979.
- BOGNI, C., RASPANTI, C., ODIERNO, L. et al. Síntesis de enterotoxinas e resistência a antibióticos de estafilococos aislados de mastitis bovina. **Rev. Med. Vet.**, v.78, n.4, p.236-239, 1997.
- BOOTH, J.M., GREEN, T.J. Mastitis pathogens. **Int. Dairy Fed. Bull.** v.13, n.1, p.6, 1988.
- BORGES, M.S., RODRIGUES, R., RUBINICH, J. et al. Comparison of the quality of two types of milk at two sources in Belo Horizonte, Brazil market. **J. Food Protect.** v.41, n.9, p.739-742, 1978.
- BRAMLEY, A.J., DODD, F.H. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control: progress and prospects. **J. Dairy Res.** v.51, n.3, p.481-512, 1984.
- BRANDÃO, S.C.C. A hora de decidir a reestruturação da cadeia do leite. **Rev. Ind. Latic.** n.16, p.20-24, 1998.
- BRASIL. Autorização de uso de produto (Ofício N° 196/98). Brasília: MARA, 1998a.
- BRASIL. Autorização de uso de produto (Ofício N° 0122/97). Brasília: MARA, 1997a.
- BRASIL. Métodos analíticos oficiais para análise de produtos de origem animal. II: Métodos Físicos e Químicos. Brasília: MARA, 1981.
- BRASIL. Métodos de análise microbiológica de alimentos. Brasília: MARA/LARA, p.89-96, 1992.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria Executiva, SIH/SUS, DATASUS, Brasília-DF, 1998.
- BRASIL. Regulamento técnico de identidade e qualidade dos produtos lácteos (Portaria 146). Brasília: MARA, 1996. 50p.
- BUCHANAN, R.L. Predictive food microbiology. **Trends Food Sci. Technol.** v.4, n.1, p.6-11, 1993.
- BUCHANAN, R.L., PHILLIPS, J.G. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite concentration on the growth of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Protect.** v.53, n.5, p.370-376, 1990.
- BURAGOHAIN, J., DUTTA, G.N. Susceptibility of bovine subclinical mastitis organisms to different antimicrobial agents and treatment. **Ind. J. Animal Sci.** v.60, n.5, p.550-553, 1990.

- CARDOSO, H.F.T. Identificação de fatores de virulência e susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite bovino em Minas Gerais. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1999. 88 p. Dissertação (Mestrado).
- CARMO, L.S., BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). **Rev. Microbiol.** v.21, n.4, p.320-323, 1990.
- CARMO, L.S., DIAS, R.S., ANUNCIÇÃO, L.L.C. et al. Staphylococcal food poisoning in Minas Gerais State, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.47, n.2, p.113-122, 1994.
- CASMAN, E.P. Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. **J. Bacteriol.** v.7, p.849-856, 1960.
- CASMAN, E.P., BENNET, A.E., DORSEY, A.E. The microslide gel double gel diffusion test for the detection and assay of Staphylococcal enterotoxins. **Health Lab. Sci.** v.6, n.4, p.185-198, 1969.
- CASMAN, E.P., BENNET, A.E., ISSA, J.A. et al. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. **J. Bacteriol.** v.94, n.6, p.1875-1882, 1967.
- CAUDIL, F.M., MEYER, M.A. An epidemic of food poisoning due to pasteurized milk. **J. Milk Technol.** v.6, p.73-76, 1943.
- CERQUEIRA, M.M.O.P., LEITE, M.O., FONSECA, L.M. et al. Frequência de *Listeria sp* e de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas produzido artesanalmente. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 13, 1994b, Olinda. Anais... Olinda, p.507.
- CERQUEIRA, M.M.O.P., SOUZA, M.R., FONSECA, L.M. Surto epidêmico de toxinfecção alimentar envolvendo queijo tipo Minas frescal em Pará de Minas. **Arq. Bras. Vet. Zootec.** v.46, n.6, p.723-728, 1994a.
- CHEN, J.H., HOTCHKISS, J.H. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Clostridium sporogenes* in cottage cheese in modified atmosphere packaging. **J. Dairy Sci.** v.79, n.6, p.972-977, 1993.
- CRAVEN, N., ANDERSON, J.C. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action in vitro and in vivo. **J. Dairy Sci.** v.51, n.4, p.513-523, 1984.
- DAVIDSON, J.N. Antibiotic resistance patterns in bovine mastitis pathogens. In: Proceedings. 19th Annual Meeting of the National Mastitis Council, p.181-185, 1880.
- DAVIES, E.A., BEVIS, H.E., BROUGHTON, D.J. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Appl. Microbiol.** v.24, p.343-346, 1997.
- DAVIS, J.G., WILBEY, R.A. Microbiology of cream and dairy desserts. In: Robinson, R.K. (ed). Dairy Microbiology: The microbiology of Milk Products. 2ed. London: Elsevier, 1990. v.2, p.41-108.
- DE AGUAYO, M.E.D., LEON DUARTE, A.B., CANASTILLO, F.M.O. Incidence of multiple antibiotic resistant organisms isolated from retail milk products in Hermosillo, Mexico. **J. Food Protect.** v.55, n.5, p.370-373, 1992.
- DE LUCA, G., ZANETTI, F., STAMPI, S. *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area. **Int. J. Food Microbiol.** v.35, n.3, p.267-270, 1997.
- DOHNALEK-HALPIN, M.I., MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods. A review. **J. Food Protect.** v.52, n.4, p.267-282, 1989.
- DUREL, B. Identification of post-pasteurization milk contamination. **Food Ind. South Afr.** v.36, n.1, p.48-49, 1983.

- EIFERT, J.D., GENNINGS, C., JR. W.H.C. et al. Predictive model with improved statistical analysis of interactive factors affecting the growth of *Staphylococcus aureus* 196E. **J. Food Protect.** v.59, n.6, p.608-614, 1996.
- EL QUESO fundido y las cremas de queso para untar. Aplin & Barrett LTD, 1996. (Ref. No Spl396)
- ELLIS, J.A., GODSON, D., CAMPOS, M. et al. Capture immunoassay for ruminant tumor necrosis factor-alpha: comparison with diossay. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.35, n.3, p.289-300, 1993.
- ENG, R.H., PADBERT, F.T., SMITH, S.M. et al. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and no growing bacteria. **Antimicrob. Agent Chemother.** n.35, p.1824-1828, 1991.
- EVENSON, M.L., HINDS, M.W., BERNSTEIN, R.S., BERGOLL, M.S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **Int. J. Food Microbiol.** v.7, n.4, p.311-316, 1988.
- EWALD, S. Evaluation of enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for detection of staphylococcal enterotoxin in foods. **Int. J. Food Microbiol.** v.6, n.2, p.141-153, 1988.
- FAST, D.J., SCHLIEVERT, P.M., NELSON, R.D. Nonpurulent response to toxic shock syndrome toxin 1-producing *Staphylococcus aureus* relationship to toxin-stimulated production of tumor necrosis factor. **J. Immunol.** v.140, n.3, p.949-953, 1988.
- FETROW, J. Subclinical mastitis: biology and economics. **Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.** v.11, p.223-233, 1980.
- FRANCO, B.D.G.M., LANDGRA, M. **Microbiologia de Alimentos.** São Paulo: Ateneu, 1996, p.182.
- FREED, R.C., EVENSON, M.L., REISER, R.F. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay systems for detection of Staphylococcal enterotoxins in foods. **Appl. Environ. Microbiol.** v.44, n.6, p.1349-1355, 1982.
- GENIGEORGIS, C.A. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. **Int. J. Food Microb.** v.9, n.4, p.327-360, 1989.
- GILL, J.P.S., JOSHI, D.V., KWATRA, M.S. Qualitative bacteriological survey of milk and milk products with special reference to *Staphylococcus aureus*. **Ind. J. Dairy Sci.** v.47, n.8, p.680-682, 1994.
- GOMES, H.A., GALLO, C.R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal" comercializado em Piracicaba, SP. **Ciê. Tecnol. Alim.** v.15, n.2, p.158-161, 1995.
- GÓMEZ-LUCÍA, E., GOYACHE, J., ORDEN, J.A. et al. Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental manchego-type cheese. **J. Dairy Sci.** v.75, n.1, p.19-26, 1992.
- GONÇALVES, P.M.R., FRANCO, R.M. Coliformes fecais, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal. **Rev. Bras. Ciê. Vet.** v.3, n.1, p.5-9, 1996.
- GURR, M.I. Health and nutrition aspects of dairy products: An update. **Min. Report. Food Aust.** v.44, n.9, p.421-426, 1992.
- GUTIERREZ, L.M., GARCIA LOPEZ, M.L., OTERO, A. et al. Incidence of Staphylococci in ovine mastitic milk and antibiotic susceptibility of the strains. **Milchew.** v.45, n.12, p.778-781, 1990.
- HACKLER, J.F. Outbreak of Staphylococcus milk poisoning in pasteurized milk. **Am. J. Pub. Health Ass.** v.20, p.1247-1249, 1939.
- HÀJEK, V. Identification of enterotoxigenic staphylococci from sheep and sheep cheese. **Appl. Environ. Microbiol.** v.35, p.264-268, 1978.

- HALLANDER, H.O. Production of large quantities of enterotoxin B and other staphylococcal toxins on solid media. **Acta Pathol. Microbiol. Scan.** v.63, n.2, p.229-305, 1965.
- HARMON, R.J., LANGLOIS, B.E. Mastitis due to coagulase-negative species. **Agric. Practice** v.10, n.1, p.29-33, 1989.
- HILL, A.W., FROST, A.J., BROOKER, B.E. Progressive pathology of severe *Escherichia coli* mastitis in dairy cows. **Res. Vet. Sci.** v.37, n.2, p.179-187, 1984.
- HIRSCH, A., GRINSTED, E., CHAPMAN, H.R. et al. A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin producing *Streptococcus*. **J. Dairy Res.** v.18, n.2, p.205-206, 1951.
- HONKANEN-BUZALSKI, T., MYLLYS, V., PYORALA, S. Bovine clinical mastitis due to coagulase-negative Staphylococci and their susceptibility to antimicrobials. **J. Vet. Med. B** v.41, n.5, p.344-350, 1994.
- HUST, A. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In: BRANEN, A.J., DAVIDSON, P.M. Antimicrobials in foods. New York: Marcel Dekker, 1983, p.327-351.
- IBRAHIM, G.F., BALDOCK, A.K. Thermostable deoxyribonuclease and enterotoxigenicity of Cheddar cheese made with sub-normal start activity. **J. Food Protect.** v.40, n.5, p.655-660, 1991.
- ICHICAWA, M., ICHICAWA, T., MIZOMOTO, T. Productivity of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1, and coagulase type *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovines and humans in the same district. **Anim. Sci. Technol.** v.67, n.9, p.780-786, 1996.
- IGARASHI, H., FUJIKAWA, H., SHINGAKI, M. et al. Latex agglutination test for staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1. **J. Clin. Microbiol.** v.23, n.3, p.509-512, 1986.
- IKEJIMA, T., OKUSAWA, J.W., VAN DER MEER, J.W.M. et al. Induction by toxic-shock-syndrome toxin-1 of a circulating tumor necrosis factor-like substance in rabbits and of immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 from human mononuclear cells. **J. Infect. Dis.** v.158, n.6, p.1017-1025, 1988.
- JOHNSON, H.M., BUKOVIC, J.A., KAUFFMAN, P.E. Staphylococcal enterotoxins A and B: solid-phase radioimmunoassay in food. **Appl. Microbiol.** v.26, p.309-313, 1973.
- JONES, T.O., WIENEKE, A.A. Staphylococcal toxic shock syndrome. **Vet. Rec.** v.25, p.34-45, 1986.
- JÓZEFczyk, Z. Specific human antibodies to enterotoxins A, B and C of *Staphylococcus*: their increased synthesis in staphylococcal infections. **J. Infect. Dis.** v.130, n.1, p.17, 1974.
- KAMAU, D.N., DOORES, S., PRUIT, K.M. Antibacterial activity of lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk. **J. Food Protect.** v.53, n.12, p.1010-1014, 1990.
- KENNY, K., BASTIDA, F.D., NORCROOS, N.L. Secretion of alpha-hemolysin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. **Can. J. Vet. Res.** v.56, n.3, p.265-268, 1992.
- KHAMBATY, F.M., BENNETT, R.W., SHAH, D.B. Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. **Epidemiol. Infect.** v.113, n.1, p.75-81, 1994.
- KIRK, J.H., BARTLETT, P.C. Economic impact of mastitis in Michigan Holstein dairy herds using a computerized records system. **Agric. Pract.** v.9, p.3-6, 1988.
- KIRK, J.H., DEGRAVES, F., TYLER, J. Recent progress in treatment and control of mastitis in cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.204, n.8, p.1152-1158, 1994.

- KIVANC, M. A survey on microbiological quality of various cheeses in Turkey. **Int. J. Food Microbiol.** v.9, n.1, p.73-79, 1989.
- KLEBANOFF, S.J., CLEM, W.H., LUEBKE, R.G. The peroxidase thiocyanate hydrogen peroxide antimicrobial system. **Biochim. Biophys. Acta** v.117, n.1, p.63-72, 1966.
- KLOOS, W.E. Systematics and natural history of Staphylococci. **J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.** v.70, n.3, p.255-375, 1990.
- KLOOS, W.E., LAMBE JR., D.W. *Staphylococcus*. In: BALOWS, A. Manual of clinical microbiology. 5 ed. Washington, D.C.: Am. Soc. Microbiol., 1991. P.1500.
- KRAATZ-WADSACK, G., AHSENS, W., STUCKRAD, J. ELISA screening of staphylococcal enterotoxins by means of a specially developed test kit. **Int. J. Food Microbiol.** v.14, n.4, p.305-312, 1991.
- LACHICA, R.V.F., WEISS, K.F., DEIBEL, R.H. Relationships among coagulase, enterotoxin and heat stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. **Appl. Microbiol.** v.18, n.2, p.126-127, 1969.
- LAHELLEC, C., FUNG, D.Y., CUNNINGHAM, F.E. Growth effects of sorbate and selected antioxidants on toxigenic strains of *Staphylococcus aureus*. **J. Food Protect.** v.44, n.7, p.531, 1981.
- LANCETTE, G.A., TATINI, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDEZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3.ed. Washington: APHA, 1992, p.533-547.
- LANGE, C.C., CARDOSO, M.R.I., PIANTA, C. Susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*, isolados de mamite bovina em Porto Alegre, RS, Brasil. Anais do XV CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15, 1996. Campo Grande. Anais..., 1996, p.180.
- LANGLOIS, B.E., PARLINDUNGAN, A.K., HARMON, R.J. et al. Biochemical characteristics of *Staphylococcus* species of human and bovine origin. **J. Food Protect.** v.53, n.2, p.119-126, 1990.
- LAPEYRE, C., JANIN, F., KAVERI, S.V. Indirect double sandwich ELISA using monoclonal antibodies for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D in food samples. **Food Microbiol.** v.5, n.1, p.25-31, 1988.
- LEVY, S.B. Microbial resistance to antibiotics: an evolving and persistent problem. **Lancet** v.ii, p.83-88, 1982.
- LODI, R. The use of lysozyme to control butyric acid fermentation. **Int. Dairy Fed. Bull.** n.251, p.51-54, 1990.
- LOUHI, M., INKINEN, K., MYLLYS, V. et al. Relevance of sensitivity testing (MIC) of *S. aureus* to predict the antibacterial action in milk. **J. Vet. Med.** v.39, n.10, p.723-731, 1992.
- MAC FADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2.ed. . Baltimore Williams & Wilkins: 1980, p.527.
- MACKIE, D.P., LOGAN, E.F., POLLOCK, D.A. et al. Antibiotic sensibility of bovine staphylococcal and coliform mastitis isolates over four years. **Vet. Record** v.122, p.67-75, 1988.
- MAGALHÃES, N.A. Detecção de resíduos de inibidores bacterianos em leite pasteurizado tipos A, B, C e integral / fazenda, comercializados na grande BH: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1995. p. Dissertação (Mestrado).
- MAKAYA, P.V., ARESTRUP, F.M., OLSEN, J.E. Distribution and antibiotic resistance patterns of common mastitis pathogens (Gram-positive cocci) in selected dairy herds of three dairy farming sectors in Zimbabwe. **Zimbab. Vet. J.** v.27, n.2, p.65-75, 1996.

- MANDIL, A., DRUMOND, V.A., PEREIRA, M.L. et al. *Staphylococcus aureus* em queijos tipo Minas. **Ciê. Tecnol. Alim.** v.2, n.2, p.233-241, 1982.
- MARTH, E.H. Cheese. In: **Industrial microbiology**, 4 ed., Connecticut: Reed, 1982, p.280.
- MATSUNAGA, T., KAMATA, S., KIKIICH, N. et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. **J. Med. Sci.** v.55, n.2, p.297-300, 1993.
- MESQUITA, A.J. Enumeração de *Staphylococcus* em leite cru. **An. Esc. Agron. Vet.** v.18, n.1, p.5-11, 1988.
- MEYRAND, A., BOUTRAND-LOEI, S., REY-GUENIOT, S. et al. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of camembert-type cheeses from raw goat's milk. **J. Appl. Microbiol.** v.85, n.3, p.537-544, 1998.
- MICUSAN, V.V., DESROSIERS, M., GOSSELIN, J. et al. Stimulation of T cells and induction of interferon by toxic shock syndrome toxin-1. **Rev. Infect. Dis.** v.11, suppl.1, p.305-312, 1989.
- MILLY, B.A., REISER, R.F., BERGDOLL, M.S. Detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E in foods by radioimmunoassay, using staphylococcal cells containing protein A as immunoadsorbent. **Appl. Environ. Microbiol.** v.36, n.2, p.421-426, 1978.
- MORGAN, K.L., GRUFFYD-JONES, E., WIENEKE, A.A. et al. Staphylococcal toxic shock syndrome. **Vet. Rec.** v.29, p. , 1986.
- MORISSETTE, C., GOULET, J., LAMOUREUX, G. Rapid and sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Staphylococcal enterotoxins B in cheese. **Appl. Environ. Microbiol.** v.57, n.3, p.836-842, 1991.
- MORISSETTE, C., GOULLET, J., LAMOUREUX, G. Simple and rapid inhibition enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B in foods. **J. Food Protect.** v.53, n.10, p.834-840, 1990.
- MUCKLE, C.A., PRESCOTT, J.F., JOHNSON, R. Susceptibility of *Escherichia coli* from bovine mastitis to new antimicrobial drugs. **Canad. J. Vet. Res.** v.50, n.4, p.543-354, 1986.
- MUHAMMAD, K.H., HOBLET, D.J., JACKWOOD, S. et al. Interspecific conjugal transfer of antibiotic resistance among staphylococci isolated from bovine mammary gland. **Am. J. Vet. Res.** v.54, n.10, p.1432-1440, 1993.
- MUNSON, S.H., BETLEY, M.J. Partial characterization of a new staphylococcal enterotoxin gene. In: American Society for Microbiology, 91st General Meeting, Abstracts... v.6, p.31, 1991.
- MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFLER, M.A. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 6ed. Washington D.C.: American Society For Microbiology. 1995, p.1482.
- MYLLYS, V., LOUHI, M., ALI-VEHMAS, T. Comparison of penicillin-G susceptibility testing methods of staphylococci isolated from bovine mastitis. **J. Vet. Med.** v.39, p.723-731, 1992.
- NAKANE, P.K., KAWOAI, A. Peroxidase - labeled antibody. A new method of conjugation. **J. Histochem. Cytochem.** n.22, p.1084-1091, 1974.
- NARASIMHAN, R., PADMANABAN, V.D., ULAGANATHAN, V. Interaction between concentration of preservatives and pH of the media on the growth profile of microorganisms. **Ind. Vet. J.** v. 66, n.6, p.546-552, 1989.
- NEWSOME, R.L. *Staphylococcus aureus*. **Food Technol.** v.42, n.4, p.194-195, 1988.
- NOTERMANS, S., VAN LEEUWEN, W.J., DUFRENNE, J. et al. Serum antibodies to enterotoxins produced by *Staphylococcus aureus* with special reference to enterotoxin F and toxic shock syndrome. **J. Clin. Microbiol.** v.18, n.5, p.1055-1060, 1983.

- NOUT, M.J.R. Fermented foods and food safety. **Food Res. Int.** v.27, n.7, p.291-298, 1994.
- OLIVEIRA, T.C.R.M., LEE, H.A, WYATT, G. et al. A simple and rapid antibody-capture ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxin A in food including a simple extraction step. **Int. J. Food Sci. Technol.** v.29, n.5, p.563-573, 1994.
- OLSON, J.C., CASMAN, E.P., BAER, E.F. et al. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* cultures isolated from acute cases of bovine mastitis. **Appl. Microbiol.** v.20, p.605-607, 1970.
- OWENS, W.E., RAY, C.H., WASHBURN, P.J. Effect of selected antibiotics on *Staphylococcus aureus* present in milk from infected mammary glands. **J. Vet. Med.** v.40, n.6, p.508-514, 1993.
- OWENS, W.E., RAY, C.H., WATTS, .L. et al. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. **J. Dairy Sci.** v.80, n.1, p.313-317, 1997.
- PANLILIO, A.L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.** v.13, p.582-586, 1992.
- PARK, C.E., SZABO, R. Evaluation of the reversed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D in foods. **Can. J. Microbiol.** v.32, p.723-727, 1986.
- PARK, C.E., WARBURTON, D., LAFFEY, P.J. et al. A collaborative study on the detection of staphylococcal enterotoxins in foods with an Enzyme Immunoassay kit (TECRA). **J. Food Protect.** v.59, n.4, p.390-397, 1996.
- PEARSON, J.K.L., MACKIE, D.P. Factor associated with the occurrence, cause and outcome of clinical mastitis in dairy cattle. **Vet. Rec.** v.105, n.20, p.456-463, 1993.
- PEREIRA, J.L., SALSBERG, S.P., BERGDOLL, M.S. Production of Staphylococcal enterotoxin D in foods by low-enterotoxin-producing *Staphylococci*. **Int. J. Food Microbiol.** v.14, n.1, p.19-25, 1991.
- PEREIRA, M.L., CARMO, L.S., SANTOS, E.J. et al. Enterotoxin H staphylococcal food poisoning. **J. Food Protect.** v.59, n.5, p.559-561, 1996.
- PRESERVACION de leche y productos lacteos com Nisaplin. Aplin & Barrett LTD, 1996. (Ref. NoSpl 396).
- PRINCIPLES and methods of affinity chromatography. Ralms i Lund: Pharmacia,1993. 143p.
- PRUITT, K.M., REITER, B. Biochemistry of peroxidase system: antimicrobial effect. In: Pruitt, K.M., Tenovuo, J. The lactoperoxidase system: Chemistry and biological significance. New York :Marcel Dekker, 1985.
- RASOOLY, A., RASOOLY, R.S. Detection and analysis of staphylococcal enterotoxin A in food by western immunoblotting. **Int. J. Food Microbiol.** v.41, n.3, p.205-212, 1998.
- REFAI, M., ZIENAB, M., NIAZI, S.A.H. et al. Correlation between antibiotic-resistance enterotoxigenicity and enzymatic activities of *Staphylococcus aureus* recovered from foods. **Vet. Med. J.** v.36, n.1, p.107-119, 1988.
- REITER, B. The biological significance of the non immunoglobulin protective proteins in milk : Lysozyme, Lactoferrin, Lactoperoxidase. **Dev. Dairy Chem.** v.3, p.281-336, 1985.
- REITER, B., HARNULV, G. Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. **J. Food Protect.** v.47, n.9, p.724-732, 1984.
- REYES, L., MOTA, L., COSTARRICA, L. et al. Determinación de la enterotoxigenidad de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos. **Rev. Lat. Am. Microbiol.** v.26, p.277-283, 1984.

- RICHMOND, M.H. The evolution of antibiotic resistance. The Squibb Institute for Medical Research, Princeton, 1980.
- RIEDNER, S., ALBUQUERQUE, A.J.D., BADKE, M.R.T. et al. Resistência de bactérias isoladas do leite de vacas frente a doze drogas antibacterianas. **Rev. Ciênc. Rurais** v.17, n.3, p.251-260, 1987.
- ROBBINS, R, GOULD, S., BERGDOLL, M.S. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus* strains. **Appl. Microbiol.** v.28, n.6, p.946-950, 1974.
- ROGERS, L.A., WRITTIER, E.O. Limiting factors in lactic fermentation. **J. Bacteriol.** v.16, p.211-229, 1928.
- SABIONI, G.J, HIROOKA, E.Y, SOUZA, M.L.R. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Rev. Saúde Publ.** v.22, n.5, p.458-461, 1988.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal.** FEP/EV 1998. 221p.
- SANTOS, E.C., GENIGEORGIS, C. Survival and growth of *Staphylococcus aureus* in commercially manufactured Brazilian Minas cheese. **J. Food Protect.** v.44, n.3, p.177-184, 1981.
- SANTOS, E.C., GENIGEORGIS, C., FARVER, T.B. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufactured Brazilian Minas cheese. **J. Food Protect.** v.44, n.3, p.177-184, 1981.
- SANTOS, F.A, NOGUEIRA, N.A.P., CUNHA, G.M.A. Aspectos microbiológicos do queijo tipo "coalho" comercializado em Fortaleza, CE. **Bol. CEPPA** v.13, n.1, p.31-36, 1995.
- SARKAR, S., MISTRA, A.K. Preservation of raw milk by LP-system. **Indian J. Dairy Sci.** v.47, n.2, 1994.
- SEA-IR. Nature to protect nature. Seneffe: Bienca Enzymes, [1998?].
- SENA, M.J., CERQUEIRA, M.M.O.P., SANTOS, D.A. et al. Salmonelas isoladas de queijo tipo coalho: caracterização sorológica e resistência a agentes antimicrobianos - Recife (PE). **Rev. Inst. Adolfo Lutz** v.58, n.1, p.17-22, 1998a.
- SENA, M.J., CERQUEIRA, M.M.O.P; SILVA, M.C. et al. Characterization of the pathogenic microorganisms in white cheese sold in Recife (PE). In: PANAMERICAN CONGRESS ON MASTITIS CONTROL AND MILK QUALITY, 1, 1998b, Merida, PROCEEDINGS...Merida: UNAM, 1998b. p.524-533.
- SHARP, J.C.M. **Bull. World Health Org.** n.65, p.397-406, 1987.
- SKOVGAARD, N. Facts and trends in microbial contamination of dairy products. **Bull. Int. Dairy Fed.** n.250, p.31-35, 1990.
- SOLINO NOLETO, A.L., COSTA, C., BERGDOLL, M.S. Antibodies to staphylococcal enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 in sera of patients and healthy people in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Clinical Microbiol.** v.4, p.809-811, 1986.
- SU, Y.C, WONG, A.C.L, SU, Y.C. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. **J. Food. Protect.** v.60, n.2, p.195-202, 1997.
- SU, Y.C., WONG, A.C.L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H. **Appl. Environ. Microbiol.** v.61, n.4, p.1433-1438, 1995.
- SU, Y.C., WONG, A.C.L., SU, Y.C. Detection of staphylococcal enterotoxin H by an enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Food Protect.** v.50, n.3, p.327-330, 1996.
- SWARTZ, R., JOOST, P.J., NOVELLO, J.C. Antibiotic susceptibility patterns of mastitis pathogens isolated from bloemfontein dairy herds. **J. South Afr. Vet. Ass.** v.55, n.4, p.187-193, 1984.

- TAKEUCHI, S., ISHIGURO, K., IKEGAMI, M. et al. Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. **Vet. Microbiol.** v.59, n.54, p.251-258, 1998.
- TALAM, D.A., STAATZ, D., STAATZ, A. et al. Frequency of *Staphylococcus intermedius* as human nasopharyngeal flora. **J. Clinical Microbiol.** v.27, n.9, p.2393, 1989.
- TATINI, S.R., WESALA, W.D., JEZESKI, J.J. et al. Production of staphylococcal enterotoxins A in blue, brick, mozzarella and Swiss cheeses. **J. Dairy Sci.** v.56, p.429-435, 1973.
- TEUBER, M. Microbiological problems facing the dairy industry. **Bull. Int. Dairy Fed.** n.276, p.6-9, 1992.
- THOMPSON, N.E., RAZDAN, M., KUNTSMANN, G. et al. Detection of staphylococcal enterotoxins by enzyme-linked immunosorbent assays and radioimmunoassays: comparison of monoclonal and polyclonal antibody systems. **Appl. Environ. Microbiol.** v.51, p.885-890, 1986.
- TODD, E., SZABO, R., ROBERN, H. et al. Variation in counts, enterotoxin levels and TNase in Swiss-type Cheese contaminated with *Staphylococcus aureus*. **J. Food Protect.** v.44, n.1, p.83, 1981.
- TRANTER, H.S. Foodborne Staphylococcal illness. In: Foodborne illness. p.97-102, 1991.
- TURTELL, A., DELVES-BROUGHTON, J. International acceptance of nisin as a food preservative. **Int. Dairy Fed. Bull.** n.329, p.20-23, 1998.
- USE of nisaplin in processed cheese and processed cheese preparation. Beamister: Aplin & Barret Ltd., 1991. 4p. (Technical Information Sheet).
- VALLE, J., GÓMEZ-LUCIA, E., PIRIZ, S. et al. Staphylococcal enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) production during induced goat mastitis. **J. Food Protect.** v.54, n.4, p.267-271, 1991.
- VERNOZY-ROZAND, C., MEYRAND, A., MAZUY, C. et al. Behavior and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goat's lactic cheeses. **J. Dairy Res.** v.65, n.2, p.273-281, 1998.
- WIENEKE, A.A., ROBERTS, D., GILBERT, R.J. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-1990. **Epidemiol. Infect.** v.110, n.3, p.519-531, 1993.
- WILSON, C.D. The treatment of Staphylococcal mastitis. **Vet. Rec.** v.73, n.42, p.1019-1033, 1961.
- WOLFSON, L.M., SUMNER, S.S. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: A Review. **J. Food Protect.** v.56, n.10, p.887-892, 1993.
- WYATT, G.M. Immunoassays for food poisoning bacteria and bacterial toxins. London: Chapman & Hall. 1992, p.107.
- ZADOW, J.G. Extending the shelf life of dairy products. **Food Aust.** v.41, n.9, p.935-937, 1989.

APÊNDICE

EXPERIMENTO I

Caracterização de espécies de *Staphylococcus*

<i>Staphylococcus</i>			
Propriedades	<i>Aureus</i>	<i>Intermedius</i>	<i>Hyicus</i>
Coagulase	+	+	D
Tnase	+	+	+
Hemólise	+	D	-
Mannitol (aer)	+	D	-
Mannitol (an)	+	-	-
Glicose(an)	+	+	+

Segundo Kloos, 1990
an=anaerobiose
aer=aerobiose
d=11 a 89% positivo

EXPERIMENTO II

TAMPÕES E SOLUÇÕES

PBS 1M pH 7,4

NaCl 80,0 g
KH₂PO₄ 2,0 g
Na₂HPO₄.12H₂O 28,0 g
KCl 2,0 g
Completar para um litro em água destilada

PBS 0,02M pH 7,4

Solução A
Na₂HPO₄.12H₂O 2,76 g
NaCl 9,0 g
completar para 1L de H₂O(dest.)

Solução B
Na₂HPO₄ 2,84g
NaCl 9g

Para cada litro de base preparar ¼ de ácido.

COATING BUFFER - CARBONATO/BICARBONATO - 0,02M pH 9,5

Na₂CO₃ 1,59 g (0,015M)
NaHCO₃ 2,93 g (0,035M)
Completar para um litro em água destilada. Ajustar o pH com a adição de solução salina monobásica ou dibásica.

SOLUÇÃO DE LAVAGEM

NaCl	9,0 g
Tween-20	0,5 mL
H ₂ O (dest)	1,0 L

OBS: Adicionar o tween-20 após dissolver o NaCl

SOLUÇÃO BLOQUEIO - ALBUMINA

Albumina	3,0 g
PBS	100 mL

TAMPÃO CITRATO - 0,15 M pH 5,0

Ácido Cítrico	7,3 g		
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	11,86 g	ou	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O 23,84 g

Dissolver em um litro de água destilada, ajustar o pH com a adição de ácido ou salina dibásica.

SOLUÇÃO SUBSTRATO (OPD)

Dissolver OPD para a concentração de 4mg/10mL de tampão citrato
Adicionar 1 µl de H₂O₂ concentrada (ou 5,0 mL a 30% v/v).
Misturar e imediatamente, use.

Em suma: 4mg OPD + 10ml tampão citrato + 1,0µl de H₂O₂ conc.
OBS.: Não toque ou aspire OPD. Use luvas. Produto cancerígeno.

GLICINA-HCL 0,1 M pH 2,5

Glicina	7.507 g	
H ₂ O (dest)		800 mL

Ajuste o pH com HCL conc e complete o volume para 1 L

HCL 1,0 M

HCl	82,5 mL
-----	---------

Completar volume para 1 L

ACETATO DE SÓDIO 0,1M pH 4,0

(Solução A)	Ác. acético glacial	1,2 mL
	H ₂ O (dest)	98,8 mL

(Solução B)	Acetato de Sódio anidro	1,64 g
	H ₂ O (dest)	100 mL

Junte 41 ml da solução A com 9,0 mL da solução B. Complete o volume para 100 mL Cheque o pH

TRIS 0,1 M pH 8,0

Tris	121,1 g
H ₂ O (dest)	800 mL

Ajuste o pH com HCL e complete o volume para 1,0 L

TRIS 0,01M HCL 0,5 M pH 8,0

Tris	12,11 g
HCl	29,22 g
H ₂ O (dest)	800 mL

Ajuste o pH com HCl e complete o volume para 1,0 L

ETANOLAMINA 1,0 M pH 8,0

Etanolamina 3,0 mL
 H₂O (dest) 20 mL
 Ajustar o pH com HCl e completar o volume para 50 ml

TAMPÃO BORATO 0,1M pH 7,4

Ác. bórico 6,183 g
 H₂O (dest) 1,0 L

Borax 9,535 g
 H₂O (dest) 250 mL

Adicionar 57 ml da solução de borax à solução de ác. bórico. Checar o pH e continuar adicionando até que o pH se ajustado.

TAMPÃO DE LIGAÇÃO 0,1M CARBONATO DE SÓDIO pH 8,3

Na₂CO₃ 0,098 g
 Na₂HCO₃ 8,32 g
 NaCl 29,22 g
 H₂O (dest) 1,0 L

HCL 1mM

HCl 0,825 mL
 H₂O (dest) 10,0 L
 Diluir 1000 x

EXPERIMENTO IV

TABELA PADRÃO PARA INTERPRETAÇÃO DE HALOS DE INIBIÇÃO

Antimicrobianos			Padrão interpretativo		
			Zonas de inibição em mm		
			Resistente	intermediário	Sensível
Penicina G	10UI	(AMP)	≤28	-	≥29
Vancomicina	30μg	(VAN)	≤9	10 a 11	≥12
Cefaclor	30μg	(CFC)	≤14	15 a 17	≥18
Eritromicina	15μg	(ERI)	≤13	14 a 22	≥23
Rifampicina	5μg	(RIF)	≤16	17 a 19	≥20
Estreptomicina	10μg	(EST)	≤11	12 a 14	≥15
Lincomicina	2μg	(LIN)	≤14	15 a 16	≥17
Ampicilina	10μg	(AMP)	≤28	-	≥29
Kanamicina	30μg	(KAN)	≤13	14 a 17	≥18
Gentamicina	10μg	(GEN)	≤12	13 a 14	≥15
Oxacilina	1μg	(OXA)	≤10	11 a 12	≥13
Novobiocina	1μg	(NOV)	≤17	18 a 21	≥22

Adaptado do NCCLS

EXPERIMENTO V

Contagens individuais de *Staphylococcus aureus* isolados de queijos frescal com leites adicionados dos conservantes LPS ou Nisina e armazenados a 10⁰ ou 30⁰ C por 48h

TEMP.		TRATAMENTOS						
10°C	DIL.	1	2	3	4	5	6	7
-2	0	21000	999999999	14000	999999999	100000	999999999	
-3	0	30000	10000000	50000	10000000	150000	10000000	
-4	0	10000	15500000	100000	12600000	500000	122000000	
-2	0	19000	999999999	20000	999999999	14000	999999999	
-3	0	100000	12000000	150000	10000000	70000	11000000	
-4	0	200000	16000000	100000	13000000	500000	44000000	
-2	0	13000	999999999	70000	999999999	15000	999999999	
-3	0	90000	2000000	350000	10000000	80000	12000000	
-4	0	500000	1100000	1000000	12000000	600000	22000000	
-2	0	14000	999999999	15000	999999999	12000	999999999	
-3	0	40000	12000000	70000	10000000	70000	9800000	
-4	0	200000	20000000	200000	20000000	100000	12000000	
-2	0	12000	999999999	15000	999999999	34000	999999999	
-3	0	40000	10000000	60000	10000000	150000	5800000	
-4	0	300000	4500000	200000	14000000	3000000	10000000	
Total	0	1589000	5103099995	2414000	5121599995	5395000	5258599995	
Média	0	105933	340206666	160933	341440000	359667	350573333	
Desvio	0	140225,057	482944914,	249778,893	482023165,	756047,964	476184068,	
CV (%)	0	132,37	141,96	155,21	141,17	210,21	135,83	

TEMP.		TRATAMENTOS						
30°C	DIL.	1	2	3	4	5	6	7
-4	0	6500000	999999999	48000000	999999999	44000000	999999999	
-5	0	96000000	450000000	120000000	380000000	190000000	430000000	
-6	0	480000000	720000000	960000000	450000000	370000000	470000000	
-4	0	60000000	999999999	34000000	999999999	62000000	999999999	
-5	0	100000000	330000000	120000000	750000000	130000000	600000000	
-6	0	190000000	1000000000	130000000	710000000	660000000	670000000	
-4	0	8400000	999999999	7200000	999999999	19000000	999999999	
-5	0	15000000	280000000	8000000	240000000	14000000	990000000	
-6	0	30000000	400000000	30000000	640000000	60000000	1000000000	
-4	0	53000000	999999999	80000000	999999999	67000000	999999999	
-5	0	80000000	660000000	98000000	680000000	100000000	960000000	
-6	0	150000000	880000000	660000000	980000000	30000000	700000000	
-4	0	19000000	999999999	24000000	999999999	46000000	999999999	
-5	0	21000000	330000000	26000000	530000000	19000000	260000000	
-6	0	10000000	510000000	100000000	500000000	20000000	1200000000	
Total	0	1318900000	5555999999	2445200000	5585999999	1831000000	5727999999	
Média	0	87926666,7	3704000000	163013333	3724000000	122066667	3818666666	
Desvio	0	121654760	4612505981	272033564	4596673952	175295451	4530695100	
CV (%)	0	138,36	124,53	166,88	123,43	143,61	118,65	

TEMP.= temperatura de incubação dos queijos
DIL= diluições utilizadas

Valores individuais do pH de queijos frescal fabricados com leite inoculado com *Staphylococcus aureus* isolados de queijos frescal com leites adicionados dos conservantes LPS ou Nisina e armazenados a 10⁰ ou 30⁰ C por 48h.

A 10⁰ C

TRATAMENTOS						
1	2	3	4	5	6	7
6,4	6,9	6,4	6,4	6,2	6,2	6,2
6,9	7	6,8	7,2	6,6	7,2	6,8
7	7,1	7	7,1	7,2	7	7,1
7,3	7,3	7,5	7,4	7,3	7,4	7,2
7,3	7,2	7,2	7,2	7,5	7	7,3

A 30⁰ C

TRATAMENTOS						
1	2	3	4	5	6	7
5,2	6	5,6	5,9	5,3	6,2	5,4
6	5,8	5,9	6,2	5,9	5,9	6,2
6,2	5,8	5,9	6	6,4	6,3	6,7
6,1	6,2	6,5	5,9	6,6	6,2	6,4
5,9	5,6	5,6	5,6	5,7	5,6	6,2

Controle físico-químico e microbiológico do leite cru e pasteurizado destinado a elaboração dos queijos

1^a Semana

Análises	LEITE CRU	LEITE PASTEURIZADO
Acidez titulada(°D)	17	17
Alizarol	Neg	
Fosfatase	Pos	neg
Peroxidase	Pos	pos
WMT	3mm	
CCS	140.000	
coliformes totais(NMP/mL)	<0,3	<0,3
Coliformes fecais(NMP/mL)	<0,3	<0,3
<i>S.aureus</i>	Ausência	ausência
Mesófilos	<2,0x10 ²	<2,0x10 ⁰
Psicrotróficos	<2,0x10 ²	<2,0x10 ⁰
inibidor	Neg	neg

2ª Semana

Análises	LEITE CRU	LEITE PASTEURIZADO
Acidez titulada(°D)	14,5	14
Alizarol	Neg	
Fosfatase	Pos	neg
Peroxidase	Pos	pos
WMT	3mm	
CCS	140.000	
coliformes totais(NMP/mL)	<0,3	<0,3
Coliformes fecais(NMP/mL)	<0,3	<0,3
<i>S. aureus</i>	Ausência	ausência
Mesófilos	<2,0x10 ²	<2,0x10 ⁰
Psicrotróficos	<2,0x10 ²	<2,0x10 ⁰
inibidor	Neg	Neg

3ª Semana

Análises	LEITE CRU	LEITE PASTEURIZADO
Acidez titulada(°D)	14	14
Alizarol	Neg	
Fosfatase	Pos	Neg
Peroxidase	Pos	Pos
WMT	3mm	
CCS	140.000	
coliformes totais(NMP/mL)	<0,3	<0,3
Coliformes fecais(NMP/mL)	<0,3	<0,3
<i>S. aureus</i>	Ausência	ausência
Mesófilos	<2,0x10 ²	<2,0x10 ⁰
Psicrotróficos	<2,0x10 ²	<2,0x10 ⁰
inibidor	Neg	neg

4ª Semana

Análises	LEITE CRU	LEITE PASTEURIZADO
Acidez titulada(°D)	14	14
Alizarol	Neg	
Fosfatase	Pos	neg
Peroxidase	Pos	pos
WMT	3mm	
CCS	140.000	
coliformes totais(NMP/mL)	<0,3	<0,3
Coliformes fecais(NMP/mL)	<0,3	<0,3
<i>S. aureus</i>	Ausência	ausência
Mesófilos	<2,0x10 ²	<2,0x10 ⁰
Psicrotróficos	<2,0x10 ²	<2,0x10 ⁰
Inibidor	Neg	neg

5ª Semana

	LEITE CRU	LEITE PASTEURIZADO
Análises	LEITE CRU	LEITE PASTEURIZADO
Acidez titulada(°D)	15,4	14
Alizarol	Neg	
Fosfatase	Pos	neg
Peroxidase	Pos	pos
WMT	3mm	
CCS	140.000	
coliformes totais(NMP/mL)	<0,3	<0,3
Coliformes fecais(NMP/mL)	<0,3	<0,3
<i>S. aureus</i>	Ausência	ausência
Mesófilos	<2,0x10 ²	<2,0x10 ⁰
Psicrotróficos	<2,0x10 ²	<2,0x10 ⁰
Inibidor	Neg	neg