

Universidade Federal de Minas Gerais
Conselho de Pós-Graduação
Escola de Veterinária



COMPARAÇÃO ANALÍTICA DA PRODUÇÃO DE TERMONUCLEASE E
O CRESCIMENTO ESTAFILOCÓCICO NO LEITE E LATICÍNIOS

Nero Dorella Filho

Belo Horizonte
Minas Gerais
1982

Nero Dorella Filho

COMPARAÇÃO ANALÍTICA DA PRODUÇÃO DE TERMONUCLEASE E
O CRESCIMENTO ESTAFILOCÓCICO NO LEITE E LATICÍNIOS

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Belo Horizonte

Minas Gerais

1982

U. F. M. G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



000108228306

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA



Med. 632

D695c Dorella Filho, Nero, 245-
Comparação analítica da produção de termonu-
clease e o crescimento estafilocócico no leite
e laticínios. Belo Horizonte, Escola de Veteri-
nária da UFMG, 2982.
45p. ilust.
Tese, Mestre em Medicina Veterinária
1. Leite - inspeção. 2. Laticínios - inspeção.
3. Termonuclease - produção. 4. Estafilococos -
crescimento. I. Título.

CDD - 637.127 7

Aprovada em: 28/05/1982

Edson Clemente dos Santos.
Prof. EDSON CLEMENTE DOS SANTOS
- Orientador -

P. C. Brant
Prof. PAULO CALDEIRA BRANT

S. N. Silva
Prof. NIVALDO DA SILVA



Dedico este trabalho aos
meus pais (in memoriam) e
aos meus irmãos.

Este trabalho contou com o suporte técnico-financeiro da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e da Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia (FEP-MVZ).



AGRADECIMENTOS

Inicialmente permito-me expressar os meus mais sinceros agradecimentos ao Prof. EDSON CLEMENTE DOS SANTOS pelo carinho e dedicação com que me distinguiu durante sua orientação.

Ao Prof. JOSÉ DE ALENCAR, então Coordenador do Curso de Tecnologia de Alimentos do Convênio CETEC/UFMG/UFV, a nível de pós-graduação, que dignamente soube avaliar minha disposição em vincular-me ao referido curso, meu preito de gratidão.

Externo meu profundo reconhecimento a todos os colegas do Ministério da Agricultura que não mediram esforços em apoiar-me na consecução deste trabalho.

Gostaria de expressar meus agradecimentos a todos os integrantes dos Departamentos de Medicina Veterinária Preventiva e Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais pela acolhida e magnífica cooperação a mim prestadas.

Também permito-me tributar preito de gratidão à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Departamento de Tecnologia de Alimentos / Instituto de Laticínios Cândido Tostes, que me propiciou as facilidades

para desenvolver os experimentos em seus laboratórios, na cidade de Juiz de Fora.

Finalmente, faço evidenciar meus agradecimentos a todos aqueles que direta e/ou indiretamente tiveram participação na elaboração desta pesquisa, seja através de um conselho amigo, compreensão, cooperação, estímulo ou experiência profissional, alicerçando-me a que lograsse êxito no meu empreendimento.



BIOGRAFIA DO AUTOR

NERO DORELLA FILHO, filho de Nero Dorella e Judith de Paula Dorella, nascido em Belo Horizonte, Minas Gerais, aos 03 dias do mês de abril de 1945.

Obteve o diploma de Médico-Veterinário em 1973, pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Em princípios de 1974 dava início às suas atividades profissionais no Instituto Vallée, em Uberlândia, Minas Gerais.

Posteriormente transferiu-se para o Ministério da Agricultura prestando serviços junto ao DIPOA, hoje SIPA, onde militou na área de Inspeção de Leite e Derivados, inicialmente no Laticínios BIG e "a posteriori" na CCPRMGL (Itambé).

Por último, pertenceu ao quadro de assessores técnicos no Setor de Leite do antigo GEIPOA, hoje SERPA.

Em março de 1977 iniciava o Curso de Mestrado na área de Tecnologia de Alimentos, Convênio CETEC/UFMG/UFV, vinculando-se posteriormente ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, incorporando-se à área de Medicina Veterinária Preventiva.

Atualmente pertence ao quadro de técnicos do Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA).

RESUMO

O crescimento estafilocócico em dois níveis de inóculos, estirpe 100A, foi estudado comparativamente com a produção de termonuclease em leite pasteurizado, leite cru, soro de queijo, creme, manteiga, leiteiro e queijo tipo Minas. O processo de extração de termonuclease nestes produtos foi avaliado com o método analítico direto.

O efeito dos inóculos iniciais de 10^3 e 10^6 UFC/ml ou g no leite pasteurizado, manteiga e queijo Minas mostrou diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) no crescimento estafilocócico a 37°C durante 48 horas, com maior crescimento coincidindo com o inóculo mais elevado. Para os demais produtos não houve diferenças significativas entre os inóculos ($P \geq 0,05$).

A maior produção de termonuclease foi estatisticamente significativa em queijo Minas após sete dias de maturação. Para os outros produtos não houve diferenças signi

ficativas para a produção de termonuclease ($P \geq 0,05$), durante o período de incubação.

Houve coerência dos achados entre a enumeração de *Staphylococcus aureus* e produção de termonuclease, entretanto, quanto aos métodos de extração e direto na detecção desta enzima não se alcançou perfeita concordância nos resultados.



SUMMARY

The staphylococcal growth (strain 100A) in two levels of inoculum was compared with thermonuclease production in pasteurized milk, raw milk, cheese whey, cream butter, buttermilk, and Minas cheese. The thermonuclease extraction method was compared with the direct analytical method in these dairy products.

The initial inoculum effect of 10^3 and 10^6 UFC/ml or g in pasteurized milk, butter and Minas cheese showed statistically significant differences ($P \leq 0,05$) in the staphylococcal growth at 37°C during 48 hours, and better growth was observed when higher inoculum was used. For other products there were no statistical significant differences between size of inoculum ($P \geq 0,05$).

The thermonuclease production in Minas cheese was higher after 7 days of ripening being statistically significant ($P \leq 0,05$). There were no statistically significant differences for thermonuclease production in other dairy products during incubation period ($P \geq 0,05$).

Comparable findings (results) were reported for Staphylococcus aureus counts and thermonuclease production. However, the thermonuclease extraction method was not similar to the direct thermonuclease detection technique in those dairy products tested.

SUMÁRIO

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Aspectos inerentes à prevalência e sua importância na saúde pública	4
2.2. Aspectos inerentes à termonuclease	8
2.3. Aspectos inerentes à relação ter- monuclease/enterotoxinas	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Material	13
3.1.1. Amostras utilizadas no ex- perimento	13
3.1.2. Meios de cultura	13
3.2. Métodos	
3.2.1. Amostras dos produtos	14
3.2.2. Preparo das amostras de leite cru, leite pasteuriz- zado, creme, leiteinho, man- teiga e soro de queijo	14

	<u>Página</u>
3.2.3. Preparo das amostras de queijo tipo Minas padronizado	15
3.2.4. Métodos microbiológicos	15
3.2.5. Técnica microbiológica para amostras de queijo tipo Minas padronizado	15
3.2.6. Extração de deoxirribonuclease termoestável (termonuclease) de amostras de leite cru, leite pasteurizado, soro de queijo tipo Minas padronizado, creme, leite e manteiga	16
3.2.7. Extração de deoxirribonuclease termoestável (termonuclease) para amostras de queijo tipo Minas padronizado	17
3.2.8. Análises estatísticas	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Leite pasteurizado	19
4.2. Leite cru	23
4.3. Soro de queijo	25
4.4. Creme	27
4.5. Manteiga	29
4.6. Leite	31
4.7. Queijo	32
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39



LISTA DE TABELAS

	<u>Página</u>
TABELA I - Comparação entre o crescimento médio estafilocócico e a produção média de termonuclease . Correlação entre o crescimento máximo e a produção máxima de termonuclease em leite pasteurizado, durante 48 horas de incubação	20
TABELA II - Comparação entre o crescimento médio estafilocócico e a produção média de termonuclease . Correlação entre o crescimento máximo e a produção máxima de termonuclease em leite cru, durante 48 horas de incubação	23

Página

TABELA III - Comparação entre o crescimento médio estafilocócico e a produção média de termonuclease. Correlação entre o crescimento máximo e a produção máxima de termonuclease em soro de queijo, durante 48 horas de incubação	25
TABELA IV - Comparação entre o crescimento médio estafilocócico e a produção média de termonuclease. Correlação entre o crescimento máximo e a produção máxima de termonuclease em creme, durante 48 horas de incubação	27
TABELA V - Comparação entre o crescimento médio estafilocócico e a produção média de termonuclease. Correlação entre o crescimento máximo e a produção máxima em manteiga durante 48 horas de incubação	29
TABELA VI - Comparação entre o crescimento médio estafilocócico e a produção média de termonuclease. Correlação do crescimento máximo e a produção máxima em leiteiro durante 48 horas de incubação	31

Página

TABELA VII - Comparação entre o crescimento médio estafilocócico e a produção média de termonuclease . Correlação entre o crescimento máximo e a produção máxima em queijo durante 7 dias de incubação	32
---	----



1. INTRODUÇÃO

Os agentes patógenos de *Staphylococcus aureus*, de capital importância higiênico-sanitária em alimentos, têm despertado muita preocupação dos pesquisadores pelas ocorrências em inúmeros casos de intoxicações alimentares. Isto se explica em razão de sua alta prevalência nos alimentos "in natura", sendo o primeiro microrganismo em escala de importância nas toxinfecções nos alimentos, em países como a Hungria, Estados Unidos e Austrália, responsável por surtos epidemiológicos de grande repercussão em produtos de origem animal (GENIGEORGIS, 1976).

Entre os produtos implicados nas intoxicações estafilocócicas alimentares, o leite e seus derivados estão envolvidos em surtos epidêmicos segundo estatística, em maior frequência, nos países em desenvolvimento, e em menor escala nos mais desenvolvidos (GENIGEORGIS, 1976).

SANTOS & GENIGEORGIS (1980) relataram o grande interesse das indústrias de alimentos no Brasil, no aproveitamento de soro de queijo para elaboração de bebidas lácteas, sorvetes, sopas, misturas de bolo, alimentos para recém-nascidos e doce de leite. Em decorrência há uma diminuição do custo destes produtos, o mesmo podendo ser citado para outro importante subproduto como o leiteiro. Estes subprodutos, o soro e

o leiteiro, ainda não foram investigados quanto ao potencial de crescimento e sobrevivência do *Staphylococcus aureus*.

Nos países em desenvolvimento, onde não existem padrões sanitários criteriosamente fiscalizados, e onde a higiene a nível industrial deixa muito a desejar, o leite e derivados podem estar envolvidos em surtos estafilocócicos em decorrência do consumo de leite cru mamífero, leite contaminado durante o transporte, leite recontaminado após a pasteurização e até mesmo a nível de consumidor (GENIGEORGIS, 1976; SANTOS et alii, 1981).

Vale salientar que uma grande porcentagem de nossos rebanhos é portadora de mamite estafilocócica (FERREIRO et alii, 1981), sendo que a mesma é responsável por altos níveis de infecções clínicas e subclínicas, o que justifica a importância deste trabalho, uma vez que a matéria prima oriunda desses rebanhos poderá apresentar riscos à saúde humana de grandes proporções sob o ponto de vista epidemiológico.

Dentre as várias enzimas produzidas pelo *Staphylococcus aureus*, a termonuclease (termo-deoxirribonuclease) se revela de fácil e rápida detecção, ainda que de modo indireto, na determinação quantitativa de toxinas estafilocócicas existentes no produto. As toxinas, se produzidas, persistem nos alimentos submetidos ao aquecimento e/ou fermentados enquanto as células de *Staphylococcus aureus* viáveis declinam em número atingindo níveis não detectáveis. Por isso, a simples determinação populacional de *Staphylococcus aureus* para se estabelecer a presença ou não de enterotoxina é de valor limitado (TATINI et alii, 1976).

Para se elucidar melhor as causas das referidas contaminações em laticínios torna-se imperativo o uso de técnicas rápidas e de grande precisão, tendo em vista os objetivos primordiais:

- 1) avaliar o crescimento e a sobrevivência de *Staphylococcus aureus* patogênico no leite e derivados e verificar a síntese de termonuclease nestes produtos;

- 2) testar e melhorar a técnica de extração de termonuclease em diferentes produtos lácteos.



2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos inerentes à prevalência e sua importância na saúde pública

As implicações do *Staphylococcus aureus* em vários surtos, através de levantamentos epidemiológicos bem documentados (MINOR & MARTH, 1972; CORDS & TATINI, 1973; BRYAN, 1976), colocam em evidência a importância deste agente patógeno sob o ponto de vista de saúde pública. Os laticínios, especificamente, figuram nestes episódios em número bastante razoável apesar dos relatórios indicarem estatísticas incompletas nos países em desenvolvimento, prejudicando a compilação destes dados com maior exatidão. O leite, por sua própria natureza e também em função de aspectos sanitários de sua obtenção, colheita, transporte e beneficiamento, se situa como alimento potencialmente capaz de sofrer contaminações e provocar surtos epidemiológicos pela veiculação de vários microrganismos e, em maior escala, do *Staphylococcus aureus*.

Na Finlândia, entre 1965 e 1974, segundo NISKANEN (1977), 50,6% de todos os surtos registrados com toxinfecção alimentar, excluindo *Salmonella*, foram provocados por bactérias do gênero *Staphylococcus*.

GENIGEORGIS & RIEMANN (1979) descreveram que nos Estados Unidos entre 1974 e 1975 o *Staphylococcus* foi responsável por 22,45% dos surtos; no Canadá (1973-1974) 37,33%; no

Japão (1971-1975) 24,45% e no Reino Unido (1973-1975) 14,41%, sendo todos relacionados com produtos alimentares. Os mesmos autores relataram que alimentos como o leite estavam envolvidos naqueles surtos e comprovaram a ocorrência nos Estados Unidos de 4,65% dos mesmos entre 1974-1975.

Pesquisadores como CAUDIL & MEYER (1943), SMITH (1957) e SHARPE et alii (1965), citaram que a ocorrência de surtos de toxinfecção estafilocócica em leite geralmente era causada por consumo de leite cru, leite contaminado após pasteurização e, ocasionalmente, contaminado a nível de consumidor.

SHARPE et alii (1965) conseguiram isolar *Staphylococcus aureus* de leite pasteurizado, contaminação esta provavelmente ocorrida em função de falha na temperatura de pasteurização ou pós-contaminação do leite pasteurizado no consumo.

No leite cru, DONNELLY et alii (1968) constataram crescimento de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxina a um nível de inóculo de 5×10^5 UFC/ml* e também verificaram, no mesmo trabalho, as condições para a produção de enterotoxina A no leite, sendo determinado que o *Staphylococcus aureus* estirpe MF24 cresceu em leite cru e leite pasteurizado.

TATINI et alii (1971) encontraram uma associação entre a enterotoxina A detectável com populações de 2 a 3 milhões de células/ml em leite relativamente livre de microrganismos competitivos.

MINOR & MARTH (1972, 1976) descreveram que o consumo de leite cru se relacionou com numerosos surtos de toxinfecção estafilocócica em vários países, porém, com a prática da pasteurização de uso quase universal hoje, houve diminuição destes casos.

No Brasil, foi realizada por WILSON (1977), na região de Paraibuna, uma pesquisa com o leite cru em duas companhias tendo sido constatadas as seguintes porcentagens de contaminação por *Staphylococcus aureus*: Companhia 1 = 77% e

* UFC = Unidades Formadoras de Colônias

Companhia 2 = 76,4%, o que indubitavelmente constituem dados alarmantes.

Em recente trabalho com leite cru conduzido na baía leiteira de Juiz de Fora, no Estado de Minas Gerais, SANTOS et alii (1981) comprovaram a prevalência de cerca de 46,9% de *Staphylococcus* patogênico, entre 78 amostras de leite, com contagens variando entre 10^3 a 10^5 UFC/ml.

Por ser um alimento cuja aceitação se incrementa aceleradamente, com grandes volumes colocados no mercado consumidor, e por ser, entre os produtos lácteos, o mais freqüente alimento contaminado, o queijo vem recebendo por parte das autoridades sanitárias uma atenção toda especial. Por isso, muitos trabalhos em todo o mundo foram e continuam sendo desenvolvidos especificamente na área de queijo.

MacDONALD (1944), HENDRICKS et alii (1959), ALLEN & STOVALL (1960) e HOBBS (1964) relataram a incidência de toxinfecção estafilocócica pela ingestão de queijos.

THATCHER et alii (1959) examinando 149 amostras de queijos detectaram níveis de $1,5 \times 10^6$ de células/g de estafilococos em oito destas amostras.

A implicação de queijos em surtos de toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* é muito grande e podemos citar, entre outros, que 76% de 125 amostras, representando 20 variedades de queijos apresentaram estafilococos; 70,4% *Staphylococcus aureus*, dos quais 7,2% exibiam *Staphylococcus aureus* potencialmente patogênicos, coagulase-positivos (MICKELSEN et alii, 1961).

De 13 amostras de queijo Cheddar incriminadas em surtos de toxinfecção estafilocócica, 11 delas apresentavam de 50 a vários milhões de células/g (DONNELLY et alii, 1964). De 343 amostras de mercado de queijo Cheddar estudadas por estes mesmos autores, 20% continham estafilococos coagulase-positivos variando de 50 a 2×10^5 /g.

SHARPE et alii (1965) constataram um envolvimento de 910 amostras em toxinfecções de diferentes variedades de queijos, coletadas em 40 fábricas da Inglaterra e País de Ga-

les. Estes autores registraram a presença de estafilococos em 9% delas contendo 5×10^5 células/g, constatando o isolamento de *Staphylococcus aureus* em leite pasteurizado, creme e leiteiro.

Em uma pesquisa, usando-se teste sorológico para detecção de enterotoxina estafilocócica em 2112 tanques com leite, para fabricação de queijos, nos Estados Unidos, a maioria Cheddar, ZEHREN & ZEHREN (1968a) constataram que 59 dos referidos tanques estavam contaminados.

TATINI et alii (1971, 1973) afirmaram que o crescimento de estafilococos em queijo atinge seu nível máximo em 24 horas e declina, como em outros alimentos fermentados, durante a fase de maturação.

A constatação do crescimento de *Staphylococcus aureus* em amostras de queijo Cheddar, obtidas no mercado em Jordanstown, a nível de 2×10^2 células/g foi feita por FITZ & OWENS (1978).

Em 1970 o Centro Nacional de Controle de Doenças (Estados Unidos) notificou a ocorrência bem documentada do primeiro surto de toxinfecção estafilocócica relacionada à manteiga, no qual foram envolvidas 24 pessoas (MINOR & MARTH, 1972).

VADHERA & HARMON (1965) afirmaram que a atividade lipolítica de estafilococos pode limitar seu crescimento em creme.

Observação de que inóculos de $1-7 \times 10^5$ células/ml de estafilococos sobreviveram em leiteiro por 4-6 dias foi feita por MINOR & MARTH (1972). Estes mesmos autores observaram que o inóculo de 10^6 organismos/g no creme aumentou a população cerca de 220 vezes a $37^\circ\text{C}/16$ horas mas houve inibição do crescimento a 23°C . Quando o creme foi inoculado com 10^3 organismos/ml e incubado a 37°C , o incremento populacional foi 350 vezes/16 horas.

SANTOS & GENIGEORGIS (1980), trabalhando com soro de queijo Minas, inocularam *Staphylococcus aureus*, estirpe 100A, a níveis de 10^3 e 10^5 UFC/ml de soro esterilizado. *Staphylococcus aureus* cresceu em ambos os níveis do inóculo,

porém, o melhor crescimento foi observado no inóculo mais alto ($P \leq 0,05$). Ainda SANTOS & GENIGEORGIS (1980) citaram que o soro de queijo tipo Minas pode apresentar níveis estafilocócicos iguais ou superiores aos encontrados no leite destinado à elaboração de queijo, já que as células estafilocócicas sobrevivem ao estágio inicial da fabricação de queijo tipo Minas.

Em trabalho com produtos lácteos fluídos IKRAM & LUEDECKE (1977) mostraram que produtos com alto teor lipídico apresentavam menor concentração celular em relação aos produtos com menor teor lipídico, resultados estes que foram similares aos de MINOR & MARTH (1972).

MARKUS & SILVERMAN (1970) relataram que a produção de enterotoxina A ocorreu durante a fase de crescimento e foi correlacionada com a contagem celular. Também menor crescimento ocorreu em produtos com alto teor lipídico, esperando-se menor produção de enterotoxina nestes produtos.

IKRAM & LUEDECKE (1977) constataram que a quantidade de enterotoxina produzida entre produtos com baixo teor lipídico e de alto teor, foi estatisticamente significativo a nível de 5% de probabilidade.

DONNELLY et alii (1968) e TATINI et alii (1971), relataram que doenças podem se manifestar pela ingestão de alimentos contendo índices de 10^5 a 10^6 UFC/ml ou g, pois nestes limites já existe possibilidade de produção suficiente de enterotoxina, sendo que as mesmas são passíveis de sobrevivência mesmo após o processamento tecnológico como fabricação de queijos, por exemplo.

2.2. Aspectos inerentes à termonuclease

A identificação de enterotoxinas estafilocócicas é laboriosa, consumindo um grande tempo para sua execução.

Por isso, vários pesquisadores (CUNNINGHAM, 1956; CHESBRO & AUBORN, 1967) sugeriram a detecção de termonuclease em alimentos como indicador da multiplicação de *Staphylococcus*

aureus, descrevendo a alta estabilidade térmica que possui esta enzima.

LACHICA et alii (1972) e TATINI et alii (1975) afirmaram ser a termonuclease tão resistente aos agentes físico-químicos como o são as enterotoxinas.

Deve ser ressaltada a marcada tolerância exibida pela termonuclease ao prolongado aquecimento, prolongada estocagem e proliferação bacteriana competitiva, segundo LACHICA et alii (1972).

O aquecimento e o baixo pH que destroem *Staphylococcus aureus* não afetam a termonuclease e por isso CHESBRO & AUBORN (1967); LACHICA et alii (1972); CORDS & TATINI (1973); TATINI et alii (1975), preconizaram a técnica usando a enzima (DNase) para detecção de crescimento estafilocócico em alimentos aquecidos ou fermentados.

CHESBRO & AUBORN (1967) observaram que nuclease era produzida à qualquer temperatura que permitisse o crescimento estafilocócico. Os mesmos autores afirmaram que a detecção de 0,34 unidades de nuclease indicava contaminação estafilocócica com certeza, porém a este nível é improvável que concentrações toxêmicas de enterotoxina sejam esperadas.

A importância da termonuclease em testes de rotina com alimentos suspeitos de contaminação estafilocócica é indicada por LACHICA et alii (1971). Esta enzima pode minimizar o trabalho de laboratório pela substituição de procedimentos de contagens viáveis e outras limitações que podem ser assim enumeradas: a) aquecimento de alimentos processados destrói os estafilococos, mas os alimentos podem ainda causar toxinfecção alimentar devido à resistência ao calor exibida pelas enterotoxinas; b) estafilococos podem morrer durante a estocagem no mercado enquanto as enterotoxinas persistem; c) crescimento microbiano competitivo pode mascarar a presença de estafilococos que inicialmente produziram enterotoxina nos alimentos.

Realçando a importância da termonuclease, trabalho de LACHICA (1976) realizado com 68 isolamentos de

Staphylococcus epidermidis, mostrou que 50% produziram nuclease termolábil; cinco entre 10 micrococos também exibiram nuclease termolábil.

Um método simples e relativamente rápido foi descrito por LACHICA et alii (1971) que se traduz pela catalização enzimática da despolimerização do complexo formado pelo DNA-azul de toluidina ágar, facilitando a visualização da coloração rósea do meio. A comprovação de que todas as estirpes de *Staphylococcus aureus*, incluindo-se as enterotoxigênicas, produzem termonuclease foi feita por LACHICA et alii (1971), RAYMAN et alii (1975), SPERBER & TATINI (1975).

A técnica de difusão metacromática, descrita por LACHICA et alii (1972), é complementada com métodos de extração de termonuclease desenvolvidos por TATINI et alii (1975).

Em pesquisa realizada por NISKANEN & KOIRANEN (1977) constatou-se a presença de DNase em todas 276 estirpes de *Staphylococcus aureus* coagulase positivas e coagulase negativas examinadas, sendo que os fracos produtores foram mais incidentes entre as estirpes não toxigênicas do que as toxigênicas, com teor enzimático de 0,01 g/ml.

A possibilidade da perda de habilidade quanto à produção de coagulase por *Staphylococcus aureus* patogênicos foi observada por OMORI & KATO (1959), porém, LACHICA et alii (1969) e BARRY et alii (1973), constataram que a produção de termonuclease parece ser uma propriedade constante do microrganismo.

A produção de termonuclease pelas estirpes de *Staphylococcus aureus* se faz em todas as condições nas quais o crescimento é possível e/ou nas quais teores identificáveis de enterotoxinas são produzidos segundo CORDS & TATINI (1973).

A literatura (KAMMAN & TATINI, 1977), também cita o fato de que o ensaio da termonuclease para ser satisfatório como indicador de crescimento estafilocócico em alimentos prontos para o consumo, deve ser específico para medir o crescimento, bem como exequível para aplicação como teste de rotina de controle de qualidade para indústrias.

Trabalhos realizados por CORDS & TATINI (1973) revelaram detecção de DNase em queijos com populações estafilocócicas de 3×10^6 UFC/g, enquanto CHESBRO & AUBORN (1967) encontraram valores de 3×10^3 UFC/g. CORDS & TATINI (1973) afirmaram que tal discrepância é um reflexo da natureza do meio de crescimento, condições de crescimento, variável recuperação de *Staphylococcus aureus* influenciado pelo meio seletivo na enumeração e a variabilidade da estirpe de *Staphylococcus aureus* na produção de DNase. Os mesmos autores relataram que a mera presença de DNase detectável no queijo é uma indicação de um crescimento não usual de *Staphylococcus aureus* (pelo menos 1×10^6 UFC/g).

Detecção desta enzima em creme, leite integral, leite desnatado e soro de queijo com populações estafilocócicas de 5×10^5 UFC/ml com 3 a 4 horas de incubação, a 37°C , foi constatada por TATINI et alii (1975).

Ainda esses autores preconizaram a detecção de DNase em queijos com população de *Staphylococcus aureus* de 1×10^6 UFC/g, em trabalho elaborado no mesmo ano.

A estimativa quantitativa da termonuclease, segundo SCHOUWENBURG-van et alii (1978) requer um crescimento estafilocócico da ordem de 10^6 a 10^7 /g em queijos.

TATINI et alii (1976) observaram níveis detectáveis de termonuclease quando *Staphylococcus aureus* inoculado em soro de queijo Gouda a nível de 10^3 UFC/ml atingiu níveis de cerca de 10^5 UFC/ml após 4 horas de incubação a 37°C .

SANTOS & GENIGEORGIS (1980) constataram produção de termonuclease em soro de queijo Minas após 2 horas de incubação com inóculo inicial de 10^5 UFC/ml e quando o crescimento atingiu cerca de 10^7 UFC/ml.

2.3. Aspectos inerentes à relação termonuclease/enterotoxinas

A produção de DNase e enterotoxinas pelo *Staphylococcus aureus*, estirpe 234, foi comparada por CHESBRO & AUBORN (1967),

deduzindo-se que 0,34 unidades de DNase correspondem à produção de $9,5 \times 10^{-3}$ g de enterotoxina, sendo que havia sincronia nas variações e que a sensibilidade da detecção enzimática de DNase foi comparável à sensibilidade da detecção sorológica de enterotoxina A.

Também CORDS & TATINI (1973) demonstraram as estreitas correlações entre o crescimento do *Staphylococcus aureus* e produção de DNase; e entre DNase e produção de enterotoxina, em vários tipos de queijos experimentalmente inoculados com *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos, observando-se que a enzima e a enterotoxina A podiam ser detectadas em queijos conservados durante três anos a 4,4°C. Estes mesmos autores afirmaram que os dados das relações existentes entre crescimento estafilocócico, produção de enterotoxina e conteúdo de DNase indicavam que esta última servia como indicadora da presença de enterotoxina em alimentos onde ocorriam tais crescimentos, a qual é estável às condições de processamento e estocagem, a despeito de que o tipo de bactéria láctica e o grau de atividade desta bactéria (normal, falta parcial ou falta completa) durante a elaboração do queijo afetar a produção de DNase.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Amostras utilizadas no experimento

As amostras de leite cru, leite pasteurizado, creme, soro de queijo tipo Minas padronizado, queijo tipo Minas padronizado, leite e manteiga foram obtidas no Instituto de Laticínios Cândido Tostes, em Juiz de Fora (MG), no Departamento de Tecnologia de Alimentos da EPAMIG** durante o período de setembro a dezembro de 1980.

3.1.2. Meios de cultura

Baird Parker (Difco), para enumeração específica de *Staphylococcus aureus**, seguida de identificação confirmativa no meio de Coagulase Ágar.

Toluidina Deoxirribonuclease Ágar (Difco), para o método de difusão metacromática no que tange à pesquisa de termonuclease.

Gema de ovo (Egg yolk) (Difco) - enriquecedor para o meio de cultura Baird Parker.

* S. aureus, estirpe 100A, fornecida por C. Genigeorgis, UCD (USA).

** EPAMIG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

3.2. Métodos

3.2.1. Amostras dos produtos

As amostras destinadas ao experimento obedeceram ao seguinte critério de colheita (APHA, 1967):

- leite cru - a nível de recepção, colhido em beaker esterilizado de 500 ml;

- leite pasteurizado (72-75°C/20") - colhido diretamente da torneira de prova do pasteurizador;

- creme - obtido a partir de padronização do leite recebido sendo, em seguida, depositado em latões para estocagem em câmaras frias e, posteriormente, destinado ao fabrico de manteiga;

- manteiga - coletada diretamente da bateadeira;

- leiteinho - obtido a partir da bateção de creme selecionado, a nível de laboratório, fazendo-se uso de bateadeira de bolos;

- soro de queijo tipo Minas padronizado - coletado após a primeira prensagem nos tanques de fabricação de queijos. Os recipientes para colheita recebiam o mesmo tratamento descrito acima para o leite.

3.2.2. Preparo das amostras de leite cru, leite pasteurizado, creme, leiteinho, manteiga e soro de queijo

Com exceção das amostras de leite cru e pasteurizado, as demais amostras foram pasteurizadas a nível de laboratório pelo sistema LTLT (Low Temperature Long Time), ou seja, 65°C/30', sendo que somente as amostras de creme sofreram um tratamento térmico de 80°C/30'. Logo em seguida, as amostras eram assepticamente distribuídas em frascos de diluição de 100 ml cada, para posteriormente, proceder-se à inoculação da estirpe selecionada de *Staphylococcus aureus* 100A nas concentrações de 10^3 e 10^6 UFC/ml; em seguida, eram as amostras incubadas a 37°C por um período de até 48 horas.

3.2.3. Preparo das amostras de queijo tipo Minas padronizado

As amostras de queijo tipo Minas padronizado (+ 850 g), eram tomadas a partir do corte e prensagem inicial da massa a nível de tanque de fabricação e eram depositadas em formas para processamento do "cheddaring", ou seja, processo de triturar a massa com as mãos (previamente desinfetadas) até obtenção de um conteúdo homogêneo, quando então processava-se a inoculação da cultura pura do *Staphylococcus aureus* patogênico estirpe 100A. Após inoculação de 10^3 e 10^6 UFC/g, a massa era revolvida para que houvesse uma distribuição uniforme de inóculo. Em seguida, era realizada a enformagem com posterior prensagem por 1,5 horas, usando-se pesos individuais de 10 kg para 1 kg de massa. Imediatamente após a prensagem, realizava-se a salga em salmoura (20°B) durante 16 horas.

3.2.4. Métodos microbiológicos

A metodologia microbiológica para os produtos lácteos obedeceu ao princípio de preparo das amostras após inoculação e incubação por 48 horas, sendo plaqueadas no meio de cultura Baird Parker (BP) com as diluições ajustadas segundo o inóculo bacteriano.

Foi adotado o método de "streaking" para a semeadura, ou seja, a distribuição do inóculo na superfície do meio de ágar com auxílio das alças de Drigalsky. Após incubação a 37°C por 48 horas, processava-se a leitura em contador de colônias de Spencer.

3.2.5. Técnica microbiológica para as amostras de queijo tipo Minas padronizado

Para as amostras de queijo obedeceu-se ao seguinte critério: após a salga, as amostras eram assepticamente cortadas e 25 g das mesmas eram depositadas em jarras tipo

Mason previamente esterilizadas, nas quais também se depositavam 225 ml de água destilada esterilizada como diluente, estabelecendo-se assim a diluição inicial 1:10.

A jarra, em seguida, era acoplada em liquidificador Walita modelo LS 220 que, com a velocidade máxima operava por 2 minutos, triturando-se a amostra e alcançando a homogeneização. A amostra estava então apta para ser semeada no meio BP, sendo que o restante do processamento obedecia ao critério anteriormente descrito para os outros produtos, acrescentando-se o fato de que foram tomadas as leituras nos tempos previamente delineados no experimento com 0, 24, 48 horas e 7 dias de maturação.

3.2.6. Extração de deoxirribonuclease termoestável (termonuclease) de amostras de leite cru, leite pasteurizado, soro de queijo tipo Minas padronizado, creme, leiteiro e manteiga

O método aqui aplicado foi descrito originalmente por LACHICA et alii (1971) e modificado por TATINI et alii (1975) que consiste na mistura de 20 g ou ml da amostra com 40 ml de água destilada.

Em seguida, processava-se ao acerto de pH (pH=4,5), no potenciômetro Beckman.

Após a centrifugação o sobrenadante era tratado com 0,05 volumes de ácido tricloroacético 3M e se recentrifugava por mais 30 minutos. Desprezava-se o sobrenadante e ajustava-se o pH do precipitado para 8,5 com NaOH 1N e se ressuspendia em um volume final de 2,0 ml em tampão Tris (hidroximetil aminometano) pH 9,0.

O volume era aquecido à temperatura de ebulição por 15 minutos (para inativar as nucleases termolábeis).

A técnica de determinação consistia na deposição de 9,5 ml de Ágar DNA Azul de Toluidina em microplacas. Após solidificação do ágar as placas foram estocadas a 4°C por uma hora antes do ensaio (CORDS & TATINI, 1973).

Com auxílio de uma cânula foram abertos orifícios de 3 mm de diâmetro no ágar e as placas foram incubadas a 37°C por 4 horas com os orifícios preenchidos por porções das amostras (cerca de 5 µl, processo direto e por porções de enzima concentrada, processo extrativo).

Após a incubação, as zonas de coloração rósea desenvolvidas em torno dos orifícios, foram medidas com paquímetro (Mitutoyo, com precisão de até 0,02 mm).

3.2.7. Extração de deoxirribonuclease termoestável (termonuclease) para amostras de queijo tipo Minas padronizado

Todo o processamento foi idêntico ao registrado para os outros produtos, ressaltando-se apenas o número de leituras, ou seja, com 24, 48 horas e 7 dias de maturação.

3.2.8. Análises estatísticas

O método analítico, sob o ponto de vista estatístico, foi o de blocos inteiramente casualizados, com o seguinte esquema fatorial: 2 inóculos x 2 processos quanto à produção de termonuclease para todos os produtos e apenas 2 inóculos quanto ao crescimento bacteriano para todos os produtos, com exceção do queijo (SNEDECOR & COCHRAN, 1967).

Para o queijo adotou-se o seguinte esquema: 2 inóculos x 4 tempos quanto ao crescimento bacteriano e 2 inóculos x 3 tempos x 2 processos quanto a produção de termonuclease.

As médias para cada tratamento foram comparadas pelo teste t de Student ao nível de 5% através do cálculo da diferença mínima significativa (dms).

$$dms = t \times \sqrt{\frac{s^2}{n_1} + \frac{s^2}{n_2}}$$

onde: t é o valor tabelado de t dependendo do nú-

mero de graus de liberdade;

s^2 é a variância do erro;

n_1 e n_2 equivalem ao número de repetições de cada um dos tratamentos comparados.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Leite pasteurizado

A escolha destes produtos lácteos para esta pesquisa se deveu às recomendações subsidiadas nos experimentos de CAUDIL & MEYER (1943), SMITH (1957), SHARPE et alii (1965) que constataram ocorrência e isolamentos de *Staphylococcus aureus* em algumas amostras de leite pasteurizado. Entre outros autores NISKANEN (1977) constatou, na Finlândia, entre 1965 e 1974, o índice de 50,6% de surtos provocados por bactérias do gênero *Staphylococcus*, entre todos os surtos registrados com toxinfecção alimentar, excluindo *Salmonella*. GENIGEORGIS & RIEMANN (1979) descreveram surtos em vários países e TATINI et alii (1971) detectaram enterotoxina A em leite com populações de 2 a 3 milhões de células/ml, relativamente livre de microrganismos competitivos. Também DONNELLY et alii (1968) verificaram as condições para a produção de enterotoxina A no leite, sendo que a estirpe MF24 de *Staphylococcus aureus* cresceu bem em amostras de leite cru e pasteurizado.

Estes registros, indubitavelmente, sugerem a realização de pesquisas em nosso meio para melhor avaliar as condições de surtos epidêmicos neste setor, nos países em desenvolvimento.

No que concerne à produção de termonuclease, não

se constatarem diferenças estatisticamente significativas entre os inóculos iniciais 10^3 e 10^6 UFC/ml durante o período de 48 horas de incubação ($P \geq 0,05$). Também na confrontação dos referidos processos ta^* e tb^{**} , não ocorreram diferenças estatisticamente significativas em função dos inóculos iniciais 10^3 e 10^6 UFC/ml ($P \geq 0,05$), não podendo ser demonstrada a eficiência do processo extrativo da enzima no leite pasteurizado.

TABELA I - Comparação entre o crescimento médio estafilocócico e a produção média de termonuclease. Relação entre o crescimento máximo e a produção máxima de termonuclease em leite pasteurizado, durante 48 horas de incubação

Inóculos*	Tempo (h)	Crescimento médio estafilocócico** UFC/ml	Produção média TDA-ase***		Relação entre contagem máxima e produção máxima de TDA-ase	
			Ta****	Tb****	<i>S. aureus</i>	TDA-ase
10^3 UFC/ml	12	7,68	NT	NT	NT	NT
	24	7,50	NT	NT	NT	NT
	48	5,93	0,78	0,79	6,12	0,85
10^6 UFC/ml	12	8,12	NT	NT	NT	NT
	24	8,01	NT	NT	NT	NT
	48	7,14	0,98	0,92	7,42	1,18

* *Staphylococcus aureus* estirpe 100A

** Valores médios expressos em UFC (\log_{10})

*** Valores médios expressos em mm de diâmetro

**** Ta (processo direto); Tb (processo extrativo)

NT = Não testado

Comparando os inóculos iniciais de 10^3 e 10^6 UFC/ml de *Staphylococcus aureus* no leite pasteurizado constatou-se a ocorrência de diferença estatisticamente significativa somente para o crescimento estafilocócico após 48 horas de incubação ($P \leq 0,05$).

ta = processo direto

tb = processo extrativo

Na confrontação dos tempos de incubação de 12, 24 e 48 horas, registrou-se maior crescimento estafilocócico logo após a inoculação no início do período, ocorrendo diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de 12 e 24 horas em relação ao de 48 horas, isto em função dos inóculos iniciais de 10^3 e 10^6 UFC/ml ($P \leq 0,05$).

A observada diferença significativa ($P \leq 0,05$) no crescimento estafilocócico, com diminuição do número de UFC/ml após incubação por 48 horas em relação ao tempo de incubação de 12 e 24 horas se explica pela possível saturação do meio com produtos de ação tóxica, ou mesmo a superpopulação inicial até a fase de declínio na curva de crescimento. Estes fatores causam a morte destas células, confirmada por outros experimentos conduzidos por TATINI et alii (1971), GENIGEORGIS (1974) que ainda determinaram a produção de toxinas em vários tipos de alimentos após 4 horas ou mais de incubação. O tamanho inicial do inóculo foi fator decisivo no maior crescimento estafilocócico, também confirmado nos ensaios de experimentos de THATCHER et alii (1962), GENIGEORGIS & SADLER (1966) e GENIGEORGIS (1969).

O meio de cultura Baird Parker agar foi preferido para as análises de enumeração quantitativa de *Staphylococcus aureus*, para todos os produtos deste trabalho, devido às evidências de pesquisas conduzidas por NISKANEN & ALTO (1978) e RAYMAN et alii (1978) que mostraram maior recuperação deste microrganismo em queijo e leite ou carne em relação aos outros meios de cultura utilizados como KR agar*, MS agar*, TP agar*, Calf blood agar, Vogel Johnson agar, Carter agar e Staph 110 agar.

KR = Kalium rhodanid-actidione-natriumazid-ligelb-pyruvat (KRANEP) agar
MS = Milk salt agar
TP = Tellurite polymixin egg yolk agar

Pôde-se confirmar nesta investigação de termonuclease em leite os achados de TATINI et alii (1975), quando detectaram esta enzima no leite integral com níveis de estafilococos acima de 5×10^5 UFC/ml, porém a metodologia experimental usada não se identifica com a deste trabalho. Portanto, a indicação de LACHICA et alii (1971) para investigar esta enzima na rotina de controle de crescimento estafilocócico em alimentos, através de um método simples e relativamente rápido, parece-nos bastante viável e de fácil execução, também recomendada por outros pesquisadores como CORDS & TATINI (1973).

Pesquisadores como CUNNINGHAM et alii (1956) e CHESBRO & AUBORN (1967) já sugeriam a detecção de termonuclease em alimentos como indicador da multiplicação de *Staphylococcus aureus*, devido à alta estabilidade térmica que possui esta enzima.

A comparação da área do halo da reação metacromática do complexo agar-DNA-azul de toluidina por difusão serviu para a interpretação quantitativa da produção de termonuclease, não se chegando à transformação em unidades de enzima através da curva padrão, por tratar-se somente de estudo comparativo.

Na comparação da produção máxima de termonuclease com o crescimento máximo de *Staphylococcus aureus* patogênico nos ensaios delineados, após incubação por 48 horas houve diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) na enumeração do *Staphylococcus aureus* entre os inóculos 10^3 e 10^6 UFC/ml, conforme TAB. I.

Quanto a produção da enzima termonuclease para o mesmo período de tempo e com os mesmos inóculos iniciais, constatou-se não existir diferença estatisticamente significativa ($P \geq 0,05$), apesar de haver maior produção de enzima termonuclease no leite pasteurizado com 10^6 UFC/ml.

4.2. Leite cru

TABELA II - Comparação entre o crescimento médio estafilocócico e a produção média de termonuclease. Relação entre o crescimento máximo e a produção máxima de termonuclease em leite cru, durante 48 horas de incubação

Inóculos*	Tempo (h)	Crescimento médio estafilocócico**	Produção média TDA-ase***		Relação entre contagem máxima e produção máxima de TDA-ase	
		UFC/ml	Ta****	Tb****	<i>S. aureus</i>	TDA-ase
10 ³ UFC/ml	12	6,50	NT	NT	NT	NT
	24	6,66	NT	NT	NT	NT
	48	6,62	0,50	0,53	7,30	0,55
10 ⁶ UFC/ml	12	7,17	NT	NT	NT	NT
	24	6,87	NT	NT	NT	NT
	48	7,18	0,71	0,78	8,20	0,85

* *Staphylococcus aureus* estirpe 100A

** Valores médios expressos em UFC (log₁₀)

*** Valores médios expressos em mm de diâmetro

**** Ta (processo direto); Tb (processo extrativo)

NT = Não testado

No leite cru não se registraram diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de 12, 24 e 48 horas de incubação, mesmo nos diferentes inóculos iniciais de 10³ e 10⁶ UFC/ml ($P \geq 0,05$), conforme ilustração da TAB. II.

Observou-se, entretanto, aparente maior enumeração estafilocócica quando o inóculo 10⁶ UFC/ml foi usado.

Entre as possíveis razões para a ausência de diferença estatisticamente significativa do número de *Staphylococcus aureus*, podem ser citadas o crescimento competitivo da flora láctica do leite e outros fatores como os inibidores naturais do leite cru. Por outro lado, pôde-se evidenciar que os fa-

tores acima descritos não foram suficientes para a destruição da flora estafilocócica.

Os crescimentos aqui verificados, em ambos os inóculos, reproduziram os resultados obtidos por DONNELLY et alii (1968), que constataram crescimento de 5×10^5 UFC/ml no leite cru, tendo ocorrido a este nível produção de enterotoxina.

Também, corroboraram com estes resultados os achados de SANTOS et alii (1981), com contagens que variavam de 10^3 a 10^5 UFC/ml após o inóculo com estirpes conhecidas de *Staphylococcus aureus*, com prevalência de cerca de 46,9% do *Staphylococcus* patogênico entre 78 amostras de leite cru.

MINOR & MARTH (1972) e IKRAM & LUEDECKE (1977), trabalhando com produtos lácteos fluídos mostraram que aqueles com alto teor lipídico apresentavam menor concentração celular em relação aos produtos com menor teor lipídico, o que vem de encontro aos nossos achados. Resultados idênticos também foram encontrados por MARKUS & SILVERMANN (1970).

O inóculo de 10^6 UFC/ml no leite cru resultou em maior produção de termonuclease do que o inóculo de 10^3 UFC/ml, em ambos os processos propostos para análise enzimática, ocorrendo diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$).

No que concerne aos processos direto e extrativo não se registraram diferenças estatisticamente significativas em função dos inóculos iniciais 10^3 e 10^6 UFC/ml ($P \geq 0,05$). A diferença entre os valores do processo extrativo é ligeiramente maior do que a do processo direto, que é viável em função da maior precipitação e posterior concentração da termonuclease quando da execução do processo extrativo, conforme metodologia de TATINI et alii (1975).

Deve-se ressaltar que os teores enzimáticos, proporcionais aos inóculos iniciais, bem como aos processos aplicados, se configuraram ao preconizado por LACHICA et alii (1972). Aqueles autores afirmaram que a enzima demonstra marcada tolerância à proliferação bacteriana competitiva, fator de grande significado em alimentos como leite cru, em relação ao *Staphylococcus aureus*.

Vale salientar a importância da pesquisa desta enzima em termos de tempo de leitura, diante das pesquisas desenvolvidas por TATINI et alii (1975) que detectaram a termonuclease em leite integral com populações estafilocócicas de 5×10^5 UFC/ml, com 3 a 4 horas de incubação, a 37°C.

Quanto à relação entre o crescimento máximo de *Staphylococcus aureus* e a produção máxima de termonuclease após 48 horas de incubação, constatou-se a não ocorrência de diferença estatisticamente significativa ($P \geq 0,05$) para o *Staphylococcus aureus* quando os inóculos iniciais foram iguais a 10^3 e 10^6 UFC/ml.

No que tange à produção da enzima termonuclease no leite cru, no mesmo período de tempo e com os mesmos inóculos iniciais, constatou-se a ocorrência de diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$), com a maior produção de termonuclease nas amostras de leite cru inoculadas com 10^6 UFC/ml.

4.3. Soro de queijo

TABELA III - Comparação entre o crescimento médio estafilocócico e a produção média de termonuclease.

Relação entre o crescimento máximo e a produção máxima de termonuclease em soro de queijo, durante 48 horas de incubação

Inóculos*	Tempo (h)	Crescimento médio estafilocócico**	Produção média TDA-ase***		Relação entre contagem máxima e produção máxima de TDA-ase	
		UFC/ml	Ta****	Tb****	<i>S. aureus</i>	TDA-ase
10^3 UFC/ml	48	7,31	0,95	1,05	8,10	1,16
10^6 UFC/ml		7,86	1,07	1,11	8,13	1,20

* *Staphylococcus aureus* estirpe 100A

** Valores médios expressos em UFC (\log_{10})

*** Valores médios expressos em mm de diâmetro

**** Ta (processo direto); Tb (processo extrativo)

Os inóculos iniciais de 10^3 e 10^6 UFC/ml no soro se comportaram da mesma maneira, não se registrando diferença estatisticamente significativa ($P \geq 0,05$), após um período de incubação de 48 horas, apesar de se registrar um maior crescimento bacteriano nas amostras inoculadas com 10^6 UFC/ml.

Os resultados com soro de queijo tipo Minas padronizado, observados por SANTOS & GENIGEORGIS (1980), inoculando *Staphylococcus aureus* estirpe 100A, a níveis de 10^3 e 10^5 células/ml de soro esterilizado não foram confirmados nesta investigação onde o crescimento não mostrou diferenças estatísticas significativas.

Deve ser realçada a importância do soro no que tange a possibilidade de apresentar níveis de estafilococos iguais ou superiores aos do leite para fabricação do queijo tipo Minas, uma vez que este microrganismo sobrevive ao estágio inicial de fabricação do queijo (SANTOS & GENIGEORGIS, 1980).

Os processos de análise da termonuclease (direto e extrativo) apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao inóculo 10^3 UFC/ml ($P \leq 0,05$).

Na confrontação entre inóculos observou-se diferença estatisticamente significativa em relação ao processo direto ($P \leq 0,05$). Apesar disto, verificou-se que os valores para o processo extrativo, em ambos os inóculos, são maiores do que os do processo direto.

A constatação da produção de termonuclease em soro de queijo, feita em nossa pesquisa, foi confirmada pelos achados de TATINI et alii (1975), que inocularam 5×10^5 células de estafilococos e TATINI et alii (1976) que constata-ram níveis detectáveis de enzima em soro de queijo tipo Gouda. Estes autores inocularam 10^3 UFC/ml de *Staphylococcus aureus* atingindo a níveis de 10^5 UFC/ml, após 4 horas de incubação a 37°C .

Também SANTOS & GENIGEORGIS (1980) observaram produção enzimática em soro de queijo tipo Minas, após decorri-

das 2 horas de incubação, tendo o crescimento atingido cerca de 10^7 UFC/ml.

Pela análise de relação entre o crescimento máximo de *Staphylococcus aureus* e a produção máxima de term nuclease, após incubação por 48 horas não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) quando os inóculos iniciais foram iguais a 10^3 e 10^6 UFC/ml.

No que concerne à produção da enzima term nuclease, no mesmo período de tempo e com os mesmos inóculos iniciais, também não houve diferença estatisticamente significativa ($P \geq 0,05$).

4.4. Creme

TABELA IV - Comparação entre o crescimento médio estafilocócico e a produção média de term nuclease. Relação entre o crescimento máximo e a produção máxima de term nuclease em creme, durante 48 horas de incubação

Inóculos*	Tempo (h)	Crescimento médio estafilocócico**	Produção média TDA-ase***		Relação entre contagem máxima e produção máxima de TDA-ase	
		UFC/ml	Ta****	Tb****	<i>S. aureus</i>	TDA-ase
10^3 UFC/ml	48	6,59	0,83	0,76	6,94	0,91
10^6 UFC/ml		6,85	0,91	0,76	7,42	1,14

* *Staphylococcus aureus* estirpe 100A

** Valores médios expressos em UFC (\log_{10})

*** Valores médios expressos em mm de diâmetro

**** Ta (processo direto); Tb (processo extrativo)

Após 48 horas de incubação do creme com os inóculos iniciais 10^3 e 10^6 UFC/ml não se registrou diferença estatisticamente significativa no crescimento do *Staphylococcus aureus* ($P > 0,05$), apesar de ter ocorrido maior crescimento bac-

teriano nas amostras inoculadas com 10^6 UFC/ml.

Por tratar-se de um produto com alto teor lipídico, a atividade lipolítica do *Staphylococcus aureus* pode limitar seu crescimento (VADHERA & HARMON, 1965), justificando-se assim estes achados.

Com o creme foram confirmados os resultados dos trabalhos de MINOR & MARTH (1972) e IKRAM & LUEDECKE (1977) em produtos lácteos fluídos, quando aqueles pesquisadores mostraram que produtos com alto teor lipídico apresentavam menor concentração celular em relação aos produtos com menor teor lipídico. Confirmaram-se também os resultados de SHARPE et alii (1965) que isolaram este microrganismo em creme.

Não se constataram diferenças estatisticamente significativas entre os processos delineados e nem entre os inóculos iniciais 10^3 e 10^6 UFC/ml ($P \geq 0,05$).

Deve-se atentar para o fato de que os valores do processo extrativo, em ambos os inóculos são menores do que os do processo direto, sem uma explicação confirmada nestes ensaios. Entretanto, pode-se justificar pela maior dificuldade de separação da enzima precipitada durante o mesmo tempo de centrifugação para os outros derivados do leite.

Estes resultados confirmaram os dados de TATINI et alii (1975), que trabalhando com creme inoculado com população estafilocócica de 5×10^5 UFC/ml e incubado por um período de 3-4 horas a 37°C , detectaram termonuclease.

No que diz respeito à relação entre o crescimento máximo de *Staphylococcus aureus* e a produção máxima de termonuclease constatou-se não haver diferença estatisticamente significativa ($P \geq 0,05$) na enumeração do microrganismo quando os inóculos iniciais foram iguais a 10^3 e 10^6 UFC/ml.

Quanto à produção da enzima no mesmo período de tempo e com os mesmos inóculos iniciais também não houve diferença estatisticamente significativa ($P \geq 0,05$), pelas mesmas razões expostas anteriormente.

4.5. Manteiga

TABELA V - Comparação entre o crescimento médio estafilocó - cico e a produção média de termonuclease. Re - lação entre o crescimento máximo e a produção mǎxima em manteiga durante 48 horas de incubação

Inóculos*	Tempo (h)	Crescimento médio esta - filocócico**	Produção média TDA-ase***		Relação entre con - tagem máxima e produ - ção máxima de TDA-ase	
			Ta****	Tb****	<i>S. aureus</i>	TDA-ase
10 ³ UFC/ml	12	5,30		NT	NT	NT
	24	5,23		NT	NT	NT
	48	3,88	NT	0,58	5,34	0,58
10 ⁶ UFC/ml	12	6,24		NT	NT	NT
	24	6,13		NT	NT	NT
	48	5,88	NT	0,71	6,11	0,90

* *Staphylococcus aureus* estirpe 100A

** Valores médios expressos em UFC (log₁₀)

*** Valores médios expressos em mm de diâmetro

**** Ta (processo direto); Tb (processo extrativo)

NT = Não testado

Entre os inóculos iniciais de 10³ e 10⁶ UFC/g constatou-se existir uma diferença estatisticamente significativa entre estes inóculos na manteiga somente no tempo de 48 horas de incubação ($P \leq 0,05$).

No que diz respeito à confrontação entre os tempos de incubação de 12, 24 e 48 horas não se registraram diferenças estatisticamente significativas, independentemente dos inóculos iniciais de 10³ e 10⁶ UFC/g ($P \geq 0,05$).

Ressalta-se neste experimento com manteiga, que a flora estafilocócica, ainda que em níveis mais baixos, manteve-se idêntica aos demais ensaios. Portanto, o inóculo inicial

maior (10^6 UFC/g) influenciou no número final de *Staphylococcus aureus* das amostras.

Nesta pesquisa notou-se a diminuição da densidade populacional de *Staphylococcus aureus* em função do tempo de incubação, o que era esperado, por tratar-se de alimento com alto teor lipídico, conforme também demonstraram os trabalhos de VADHERA & HARMON (1965), MINOR & MARTH (1972) e IKRAM & LUEDECKE (1977).

Os produtos lácteos ricos em lípidos, como a manteiga, foi citada no primeiro surto de toxinfecção estafilocócica, feita pelo Centro Nacional de Controle de Doenças (EUA) em 1970 envolvendo 24 pessoas (MINOR & MARTH, 1972).

Não se conseguiu detectar a termonuclease pelo processo direto na manteiga, talvez devido ao seu elevado teor de lípidos. Não houve sucesso nas tentativas de precipitação da enzima na manteiga, omitindo-se esta avaliação da atividade enzimática após 12 e 24 horas. Este fato também foi reportado por MARKUS & SILVERMAN (1970) e IKRAM & LUEDECKE (1977) que ainda observaram menor produção de enterotoxina A em alimentos com alto teor lipídico. Estes resultados têm validade uma vez que foi comprovada a correlação entre produção de enterotoxina e termonuclease por CHESBRO & AUBORN (1967) e CORDS & TATINI (1973).

Para o processo extrativo não se registrou diferença estatisticamente significativa ($P \geq 0,05$) entre os dois inóculos, apesar do maior crescimento bacteriano verificado no inóculo inicial de 10^6 UFC/g.

Na análise da relação entre o crescimento máximo de *Staphylococcus aureus* patogênico e produção máxima de termonuclease na manteiga, após incubação por 48 horas, constatou-se a ocorrência de diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) na enumeração do *Staphylococcus aureus* quando os inóculos iniciais foram iguais a 10^3 e 10^6 UFC/g.

No que diz respeito à produção de enzima termonu-

clease, no mesmo período de tempo e com os mesmos inóculos iniciais, não se registrou diferença estatisticamente significativa ($P \geq 0,05$), apesar de haver maior produção de termonuclease nas amostras com inóculo inicial mais elevado (10^6 UFC/g). O teor elevado de gordura na manteiga (80%) pareceu influir no método de avaliação usado.

4.6. Leiteiro

TABELA VI - Comparação entre o crescimento médio estafilocócico e a produção média de termonuclease. Relação do crescimento máximo e a produção máxima em leiteiro durante 48 horas de incubação

Inóculos*	Tempo (h)	Crescimento médio estafilocócico**	Produção média TDA-ase***		Relação entre contagem máxima e produção máxima de TDA-ase	
		UFC/ml	Ta****	Tb****	<i>S. aureus</i>	TDA-ase
10^3 UFC/ml	48	4,62	0,67	0,67	6,64	0,79
10^6 UFC/ml		5,95	0,86	0,67	7,00	1,13

* *Staphylococcus aureus* estirpe 100A

** Valores médios expressos em UFC (\log_{10})

*** Valores médios expressos em mm de diâmetro

****Ta (processo direto); Tb (processo extrativo)

O leiteiro inoculado com concentrações iniciais de 10^3 e 10^6 UFC/ml, após um período de incubação de 48 horas, não apresentou diferença estatisticamente significativa no crescimento bacteriano ($P \geq 0,05$) entre estes inóculos. Os resultados aqui encontrados confirmam os achados de MINOR & MARTH (1972) quando observaram que inóculos de $1-7 \times 10^5$ células/ml sobreviveram em leiteiro por 4-6 dias, bem como os de SHARPE et alii (1965) que detectaram *Staphylococcus aureus* em leiteiro.

Ainda em relação à produção da termonuclease no leiteiro, não se constataram diferenças estatisticamente sig-

ficativas entre os processos delineados e nem entre os inóculos 10^3 e 10^6 UFC/ml ($P \geq 0,05$).

Ressalta-se que a termonuclease detectada no processo extrativo com inóculo de 10^6 UFC/ml é menor do que o do processo direto, no mesmo inóculo. Entretanto, o teor de termonuclease é menor no processo direto, quando o inóculo é 10^3 UFC/ml, não havendo justificativa para este achado.

Na TAB. VI o segmento que diz respeito à relação nos mostra não ter ocorrido diferença estatisticamente significativa ($P \geq 0,05$) na enumeração do *Staphylococcus aureus* quando os inóculos iniciais foram iguais a 10^3 e 10^6 UFC/ml.

Quanto à produção de enzima termonuclease, no mesmo período de tempo e com os mesmos inóculos iniciais, também não houve diferença estatisticamente significativa ($P \geq 0,05$), apesar de haver maior crescimento estafilocócico e quantidade de enzima no leite inoculado com 10^6 UFC/ml.

4.7. Queijo

TABELA VII - Comparação entre o crescimento médio estafilocócico e a produção média de termonuclease.

Relação entre o crescimento máximo e a produção máxima de TDA-se no queijo, durante 7 dias de incubação

Inóculos*	Tempo (h)	Crescimento médio estafilocócico** UFC/g	Produção média TDA-ase***		Relação entre contagem máxima e produção máxima de TDA-ase	
			Ta****	Tb****	<i>S. aureus</i>	TDA-ase
10^3 UFC/g	0	4,08	NT	NT	4,47	NT
	24	4,13	0,55	0,64	6,24	0,84
	48	5,76	0,59	0,56	6,79	0,68
	7 dias	6,87	0,61	0,58	8,08	0,75
10^6 UFC/g	0	6,26	NT	NT	6,90	NT
	24	6,13	0,65	0,79	6,60	0,85
	48	6,58	0,67	0,75	7,12	0,88
	7 dias	7,70	0,85	0,84	8,12	1,03

* *Staphylococcus aureus* estirpe 100A

** Valores médios expressos em UFC (\log_{10})

*** Valores médios expressos em mm de diâmetro

**** Ta (processo direto); Tb (processo extrativo)

NT = Não testado

O inóculo 10^6 UFC/g apresentou melhor crescimento do *Staphylococcus aureus* nos tempos propostos de 0, 24, 48 e 7 dias em relação ao inóculo 10^3 UFC/g, porém, só ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os tempos de 0 e 24 horas ($P \leq 0,05$).

Na confrontação entre os tempos de maturação do queijo, observou-se, em relação ao inóculo 10^3 UFC/g, que ocorreram diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre os mesmos, excetuando-se o confronto entre 0 e 24 horas, bem como o de 48 horas e 7 dias. O crescimento bacteriano aumentou durante o período de maturação do queijo, fato também observado até 7 dias em outras pesquisas (SANTOS et alii, 1981).

Para o inóculo 10^6 UFC/g registraram-se diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre 0 hora e 7 dias, sendo que o crescimento bacteriano aumentou durante a maturação do queijo.

O comportamento da estirpe 100A do *Staphylococcus aureus* patogênico nos queijos destes experimentos foi compatível com os resultados obtidos por DONNELLY et alii (1964), e bem superiores aos achados de FITZ & OWENS (1978). Aqueles autores constataram em 11 de 13 amostras de queijo Cheddar o crescimento de 50 a vários milhões de células/g; ainda de 343 amostras de mercado de queijo Cheddar estudadas pelos mesmos autores, 20% continham estafilococos coagulase-positivos variando de 50 a 2×10^5 /g. Também podemos citar os achados de THATCHER et alii (1959) que examinando 149 amostras constataram níveis de $1,5 \times 10^6$ células/g, em oito dessas amostras.

Finalmente, corroborando nossos resultados, citamos os achados de SHARPE et alii (1965) em que 910 amostras de queijos provenientes de leite cru, 9% delas continham níveis superiores a 5×10^5 células/g.

Esta investigação se reveste de suma importância em decorrência do instrumento da comercialização deste produto e pela incidência de contaminação, estando comprovada

pelas pesquisas de MacDONALD (1944), HENDRICKS et alii (1959), ALLEN & STOVALL (1960), MICKELSEN et alii (1961), HOBBS (1964) e ZEHREN & ZEHREN (1968a) que relataram inúmeros surtos provocados por toxinfecção estafilocócica.

Quanto à produção de termonuclease não houve para os tempos de 24 e 48 horas de maturação diferença estatisticamente significativa entre os processos de análises, bem como entre os inóculos 10^3 e 10^6 UFC/g, nos mesmos períodos de tempo ($P \geq 0,05$). Em experimento idêntico em queijo SCHOUWENBURG-van (1978) cita que a termonuclease é detectável quando o crescimento estafilocócico atinge a 10^7 UFC/g.

A detecção de termonuclease em queijos tipo Minas padronizado foi comprovada, tendo em vista os resultados obtidos por CHESBRO & AUBORN (1967) com população estafilocócica de 3×10^3 /g, CORDS & TATINI (1973) com 3×10^6 UFC/g e TATINI et alii (1975) com 1×10^6 UFC/g).

Estas variações que podem ocorrer quanto à proporcionalidade entre o desenvolvimento bacteriano e produção enzimática devem ser decorrentes da natureza do meio de crescimento, condições de crescimento, variável recuperação do *Staphylococcus aureus*, segundo CORDS & TATINI (1973).

Ressalta-se, neste experimento com queijo, que a termonuclease mostrou-se persistente durante o período de maturação (LACHICA et alii, 1972).

O método analítico para a termonuclease alterado por STADHOUDERS et alii (1980) não foi usado nestes ensaios devido à necessária uniformidade na interpretação comparativa da reação entre os produtos analisados.

Na análise da relação entre o crescimento máximo estafilocócico e a produção máxima de termonuclease, após diferentes períodos de maturação, registrou-se, imediatamente após a salga (tempo considerado como 0 hora) a maior enumeração de *Staphylococcus aureus*, quando o inóculo inicial foi igual a 10^6 UFC/g de queijo. Esta diferença do número observa-

do entre os inóculos 10^3 e 10^6 UFC/g diminuiu progressivamente com a idade de maturação do queijo, sendo quase desprezível com 7 dias de maturação.

A enzima termonuclease apareceu em todos os casos analisados em níveis elevados quando o inóculo era igual ou superior a 10^6 UFC/g, observando-se ainda um aumento desta enzima no queijo à medida que decorreu o período de maturação.

O mesmo fato não pôde ser registrado quando o inóculo inicial era de 10^3 UFC/g, ocorrendo ainda falta de uniformidade na produção de termonuclease, talvez devido ao número de células e estágio de crescimento do *Staphylococcus aureus* demandando maior tempo para alcançar um número suficiente para a síntese desta enzima.

Pode-se ressaltar que a maior produção de termonuclease ocorreu no crescimento máximo de *Staphylococcus aureus* patogênico, coincidindo também com o maior tempo de maturação dos queijos.

Os resultados de todos os delineamentos de nossa pesquisa comprovam o estabelecido por CHESBRO & AUBORN (1967), LACHICA et alii (1972); CORDS & TATINI (1973) e TATINI et alii (1975) que preconizaram a técnica usando a enzima (DNase) para detecção de crescimento estafilocócico em alimentos aquecidos ou fermentados. Também confirmam os achados de LACHICA et alii (1971), RAYMAN et alii (1975) e SPERBER & TATINI (1975) que determinaram que todas as estirpes de *Staphylococcus aureus*, incluindo-se as enterotoxigênicas, produzem termonuclease.

Nossos resultados estão em consonância com os informes de CORDS & TATINI (1973) que revelaram ser a produção de termonuclease, pelas estirpes de *Staphylococcus aureus*, viável em todas as condições nas quais o crescimento é possível e/ou nas quais teores identificáveis de enterotoxinas são produzidos.

Estes achados vão de encontro ao relatado por KAMMAN & TATINI (1977) ao afirmarem que o ensaio com a termonuclease para ser satisfatório como indicador de crescimen-

to estafilocócico em alimentos prontos para o consumo, deve ser específico para medir o crescimento bem como exequível para aplicação como teste de rotina de controle de qualidade para as indústrias.

O tratamento térmico das amostras seguiram as recomendações de LACHICA et alii (1972), ERICKSON & DEIBEL (1973) e TATINI et alii (1975), pois a termonuclease é altamente resistente aos agentes físico-químicos; propriedade esta identicamente exibida pelas enterotoxinas, o que subsidia, inquestionavelmente, a avaliação enzimática como controle de contaminação estafilocócica.

OMORI & KATO (1959) observaram, no que se relaciona à produção de coagulase que há possibilidade da perda de habilidade pelo S. aureus patogênico para a produção desta enzima, não observado na estirpe 100A.

LACHICA et alii (1969) e BARRY et alii (1973) observaram que a produção da termonuclease parece ser a propriedade mais constante do S. aureus, conforme atestam os diferentes produtos lácteos de nossa pesquisa.

A pesquisa enzimática, em nosso trabalho, alicerça o preconizado por LACHICA et alii (1971) quando afirmaram que a termonuclease pode minimizar o trabalho de laboratório pela substituição de procedimentos de contagens viáveis e outras limitações que podem ser assim enumeradas: a) aquecimento de alimentos processados destrói os estafilococos, mas os alimentos podem ainda causar toxinfecção alimentar devido à resistência ao calor exibido pelas enterotoxinas; b) estafilococos podem morrer durante a estocagem no mercado enquanto as enterotoxinas persistem; c) crescimento microbiano competitivo pode mascarar a presença de estafilococos que inicialmente produziram enterotoxina nos alimentos.

5. CONCLUSÕES

1) O crescimento do *Staphylococcus aureus* em todos os produtos lácteos pode ser considerado similar ao das estirpes encontradas em casos de intoxicações alimentares, subsidiando, desta maneira, a importância deste microrganismo em termos de saúde pública;

2) apesar de não se ter alcançado uma perfeita concordância quanto aos métodos usados para quantificação da termonuclease (direto e extrativo), a aplicabilidade de tais métodos é indicada uma vez que a produção desta enzima foi coerente com a enumeração de *Staphylococcus aureus*;

3) evidenciou-se, durante os ensaios com manteiga e creme, que estes produtos por serem altamente ricos em lípidos requerem um maior tempo de centrifugação (o dobro requerido pelos outros produtos) no que tange ao processo extrativo da termonuclease;

4) sugere-se que outras investigações relacionadas ao processo de extração da termonuclease devem ser desenvolvidas com o intuito de se estabelecer diretrizes que possam melhor viabilizar esta metodologia;

5) a metodologia avaliada na pesquisa de contami-

nações estafilocócicas através da termonuclease mostra-se bem apropriada para os testes de rotina, a nível de indústrias, para controle de qualidade de produtos lácteos. Com esta facilidade e rapidez dos testes pode-se alterar a tecnologia de processamento dos referidos produtos lácteos propondo-se de imediato melhor preparo de pessoal e adequada educação sanitária, bem como rigorosa manutenção e higienização de maquinárias e equipamentos.



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, V.D. & STOVALL, W.D. Laboratory aspects of staphylococcal food poisoning from Colby cheese. J. Milk Food Technol., Ames, 23(9):271-4, 1960.
2. APHA, Standard methods for the examination of dairy products. 13a. ed. William J. Hausler Jr., Washington, D.C. 345p. 1967.
3. BARRY, A.L.; LACHICA, R.V.F.; ATCHISON, F.W. Identification of *Staphylococcus aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermostable nuclease tests. Appl. Microbiol., Washington, 25:496-7, 1973.
4. BRYAN, F.L. *Staphylococcus aureus*. In DEFIGUEIREDO & SPLITTSTOESSER, ed. Food microbiology public health and spoilage aspects. Westport, AVI, 1976. p.12-128.
5. CAUDIL, F.W. & MEYER, M.A. An epidemic of food poisoning due to pasteurized milk. J. Milk Technol., Ames, 6:73-6, 1943.
6. CHESBRO, W.R. & AUBORN, K. Enzymatic detection of the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. Appl. Microbiol., Washington, 15:1150-9, 1967.

7. CORDS, B.R. & TATINI, S.R. Applicability of heat stable deoxyribonuclease assay for assessment of staphylococcal growth and the presence of enterotoxin in cheese. J. Dairy Sci., Champaign, 56:1512-9, 1973.
8. CUNNINGHAM, L.B.; CATLIN, B.W.; PRIVATE DE GARILHE, M. A deoxyribonuclease of *Micrococcus pyogenes*. J. Am. Chem. Soc., Washington, 78:4642-5, 1956.
9. DONNELLY, C.B.; BLACK, L.A.; LEWIS, K.H. Occurrence of coagulase-positive staphylococci in Cheddar cheese. Appl. Microbiol., Washington, 12(4):311-5, 1964.
10. DONNELLY, C.B.; LESLIE, J.E.; BLACK, L.A. Production of enterotoxin A in milk. Appl. Microbiol., Washington, 16:917-24, 1968.
11. ERICKSON, A. & DEIBEL, R.H. Production and heat stability of staphylococcal nuclease. Appl. Microbiol., Washington, 25:332-6, 1973.
12. FERREIRO, L.; SANTOS, E.C.; SILVA, N. Ocorrência e etiologia de mastite bovina na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. Arq. Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 33 (1):31-7, 1981.
13. FITZ, F. & OWENS, J.J. *Staphylococcus aureus* in Cheddar cheese. Process Biochem., Walford, 13:2-8, 1978.
14. GENIGEORGIS, C. & SADLER, W.W. Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin B production. J. Bacteriol., Washington, 92:1383-7, 1966.
15. GENIGEORGIS, C.A. In: SYMPOSIUM WORLD ASSOCIATION VETERINARY FOOD HYGIENISTS, 15., Yugoslavia, 1969. p. 478-82.
16. GENIGEORGIS, C.A. Recent developments on staphylococcal food poisoning. In: ANN. FOOD HYGIENE SYMPOSIUM, 16., Pullman, Washington, 1974. p.34-93.
17. GENIGEORGIS, C.A. La importancia de las toxinas micro -

bianas en los metodos de evaluaci3n de alimentos toxi-infecciones de origen alimentario. INCAP, 1976. p.184-206.

18. GENIGEORGIS, C.A. & RIEMANN, H. Food processing and hygiene. In: H. Riemann and F. Bryan. Food borne infections and intoxications. 2ed., New York, Academic Press, 1979.
19. HENDRICKS, S.L.; BELKNAP, R.A.; HAUSLER, Jr., W.J. Staphylococcal food intoxication due to Cheddar cheese. I. Epidemiology. J. Milk Food Technol., Ames, 22:313-7, 1959.
20. HOBBS, B.C. Food poisoning: Observations on sources of Salmonellae, *Chlostridium welchii*, and Staphylococci. Ann. Inst. Pasteur Lille, Paris, 15:31-41, 1964.
21. IKRAM, M. & LUEDECKE, L.O. Growth and enterotoxin A production by *Staphylococcus aureus* in fluid dairy products. J. Food Prot., Ames, 40(11):769-71, 1977.
22. KAMMAN, J.F. & TATINI, S.R. Optimal conditions for assay of staphylococcal nuclease. J. Food Sci., Chicago, 42(2):421-4, 1977.
23. LACHICA, V.R.F.; WEISS, K.F.; DEIBEL, R.H. Relationship among coagulase, enterotoxin, and heat stable deoxy-ribonuclease production of *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol., Washington, 18:126-7, 1969.
24. LACHICA, V.R.F.; GENIGEORGIS, C.A.; HOEPRICH, P.D. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. Appl. Microbiol., Washington, 21:585-7, 1971.
25. LACHICA, V.R.F.; HOEPRICH, P.D.; GENIGEORGIS, C.A. Metachromatic agar-diffusion microslide technique for detecting staphylococcal nuclease in foods. Appl. Microbiol., Washington, 23:168-9, 1972.
26. LACHICA, V.R.F. Rapida detection de multiplicaciones

- estafilococicas en alimentos. INCAP, 1976. p.244-53.
27. LACHICA, V.R.F. Simplified thermonuclease test for rapid identification of staphylococcus recovered on agar media. Appl. Environ. Microbiol., Washington, 32(4):633-4, 1976.
 28. MacDONALD, A. Staphylococcal food poisoning caused by cheese. Montly Bull. Min. Health, Public Health Lab. Serv., UK, 3:121-2, 1944.
 29. MARKUS, Z. & SILVERMANN, G.L. Factors affecting the secretion of staphylococcal enterotoxin A. Appl. Microbiol., Washington, 20:492-6, 1970.
 30. MICKELSEN, R.; FOLTS, V.D.; MARTIN, W.H.; HUNTER, C. A. The incidence of potentially pathogenic staphylococci in dairy products at the consumer level. II. Cheese. J. Milk Food Technol., Ames, 24(11):342-5, 1961.
 31. MINOR, T.E. & MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food intoxications. A review. III. Staphylococci in dairy foods. J. Milk Food Technol., 35:77-82, 1972.
 32. MINOR, T.E. & MARTH, E.H. Staphylococci and their significance in foods. Amsterdam Elsevier, 1976.
 33. NISKANEN, A. Staphylococcal enterotoxins and food poisoning production properties and detection of enterotoxins. Espoo, Technical Research Centre on Finland, 1977. 83p.
 34. NISKANEN, A. & KOIRANEN, L. Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolate from different sources. J. Food Prot., Ames, 40(8):543-8, 1977.
 35. NISKANEN, A. & AALTO, M. Comparison of selective media for coagulase-positive enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol., Washington, 6(35): 1233-6, 1978.

36. OMORI, G. & KATO, J. A staphylococcal food-poisoning caused by coagulase negative strain. Biken J., Osaka, 2:92, 1959.
37. RAYMAN, M.K.; PARK, C.E.; PHILPOTT, J.; TODD, E.C.D. Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as means of identifying *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol., Washington, 29:451-4, 1975.
38. RAYMAN, M.K.; DEVOYOD, J.J.; PURVIS, U.; KUSCH, D.; LANIER, J.; GILBERT, R.J.; TILL, D.G.; JARVIS, G.A. ICMSF methods studies. X. An international comparative study of four media for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods. Can. J. Microbiol., Ottawa, 24:274-81, 1978.
39. SANTOS, E.C. & GENIGEORGIS, C.A. Potential for presence and growth of *Staphylococcus aureus* in Brazilian Minas cheese whey. J. Food Prot., Ames, 44(3):185-8, 1980.
40. SANTOS, E.C.; GENIGEORGIS, C.A.; FARVER, T.B. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of Brazilian Minas cheese. J. Food. Prot., 44(3):172-6, 1981.
41. SHARPE, M.E.; FEWINS, B.G.; REITER, B.; CUTHBERT, W.A. A survey of the incidence of coagulase-positive staphylococci in market milk and cheese in England and Wales. J. Dairy Res., London, 32(1):187-92, 1965.
42. SMITH, H.W. The multiplication of *Staphylococcus aureus* in cows milk. Monthly Bull. Min. Health, Public Health Lab. Serv., UK, 16:39-52, 1957.
43. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. Statistical methods. 6.ed. Ames, The Iowa State University Press, 1967. 593p.
44. SPERBER, W.H. & TATINI, S.R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol., Washington, 29:502-5, 1975.
45. STADHOUDERS, J.; HASSING, F.; GALESLOOT, T.E. A rapid

- and simple method for the detectation of *Staphylococcus aureus* thermonuclease in cheese. Neth. Milk Dairy J., Wageningen, 34:199-204, 1980.
46. TATINI, S.R.; JEZESKI, J.J.; MORRIS, H.A.; OLSON Jr. J.C.; CASMAN, P. Production of staphylococcal enterotoxin A in Cheddar and Colby cheeses. J. Dairy Sci., Champaign, 54:815-25, 1971.
47. TATINI, S.R.; WESALA, W.D.; JEZESKI, J.J.; MORRIS, H.A. Production of staphylococcal enterotoxin A in Blue, Brick, Mozzarella and Swiss cheeses. J. Dairy Sci., Champaign, 56:429-35, 1973.
48. TATINI, S.R.; SOO, H.M.; CORDS, B.R.; BENNETT, R.W. Heat-stable nuclease for assessment of staphylococcal growth and likely presence of enterotoxins in foods. J. Food Sci., Chicago, 40:352-6, 1975.
49. TATINI, S.R.; CORDS, B.R.; GRAMOLI, J. Screening for staphylococcal enterotoxins in food. Food Technol., Chicago, 30:64-74, 1976.
50. THATCHER, F.S.; COMTOIS, R.D.; ROSS, D.; ERDMAN, I.E. Staphylococci in cheese: Some public health aspects. Can. J. Public Health, Ottawa, 50:497-503, 1959.
51. THATCHER, F.S.; ROBINSON, J.; ERDMAN, I. The vacuum pack method of packaging foods in relation to the formation of the botulinum and staphylococcal toxins. J. Appl. Bacteriol., New York, 25:120-4, 1962.
52. VADHERA, D.V. & HARMON, L.G. Action of lipases of *Staphylococcus aureus* on milk fat. Appl. Microbiol., Washington, 13:335-9, 1965.
53. van SCHOUWENBURG—van FOEKEN, A.W.J.; STADHOUDERS, J.; JANS, J.A. The thermonuclease test for assessment of the growth of coagulase-positive staphylococci in Gouda cheese with a normal acidity development. Neth. Milk Dairy J., Wageningen, 32:217-31, 1978.

54. WILSON, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em leite a ser pasteurizado. Rev. Saúde Pública, São Paulo, 11: 1-11, 1977.
55. ZEHREN, V.L. & ZEHREN, V.F. Examination of large quantities of cheese for staphylococcal enterotoxin A. J. Dairy Sci., Champaign, 51:635-44, 1968a.