

Andréia Kelly Roberto Santos

COMPARAÇÃO ENTRE OS MEIOS DE CULTURA BAIRD-PARKER, BAIRD-PARKER – RPF E PETRIFILM™ STAPH EXPRESS NA DETECÇÃO DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVO EM LEITE CRU NATURALMENTE CONTAMINADO E EM LEITE ESTERILIZADO INOCULADO COM CULTURAS ESPECÍFICAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientadora: Profa. Mônica Oliveira Leite

Co-orientador: Prof. Leorges Moraes da Fonseca

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2008

S237c Santos, Andréia Kelly Roberto, 1982-

Comparação entre os meios de cultura Baird-Parker, Baird-Parker – RPF e Petrifilm™ Staph Express na detecção de *Staphylococcus* coagulase positivo em leite cru naturalmente contaminado e em leite esterilizado inoculado com culturas específicas / Andréia Kelly Roberto Santos. – 2008.

53p.: il.

Orientadora: Mônica Oliveira Leite

Co-orientador: Leorges Moraes da Fonseca

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Leite – Análise – Teses. 2. Leite – Bacteriologia – Tese. 4. *Staphylococcus* – Teses.

I. Leite, Mônica Oliveira. II. Fonseca, Leorges Moraes da. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637

Dissertação defendida e aprovada em 17 de março de 2008, pela comissão constituída por:

Profa. Mônica Oliveira Leite
Orientadora

Dr. Luiz Simeão do Carmo

Prof. Marcelo Resende de Souza

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo amor, atenção e apoio concedidos durante toda a minha vida.

À minha orientadora, Professora Mônica O. Leite, uma importante companheira na condução do mestrado, especialmente nos momentos mais críticos.

Ao Professor Leorges M. da Fonseca, por me conceder a oportunidade de cursar o mestrado ao me oferecer seu protetorado e confiança.

Ao Doutor Luiz S. do Carmo e ao doutorando Fernando Zocche pela concessão das amostras puras de *Staphylococcus* para a realização do experimento.

Aos meus amigos e colegas de mestrado Déborah, Eduardo Lara, Júnia, Pedro, Roane, Simone, Tadeu e Ticiano, por todas as conversas de corredor; ajudas no preparo de material; caronas; enfim, por tornarem esta etapa ainda mais agradável.

Aos meus demais amigos, Alice, Cíntia, Denise, Fatinha, Flávia, Gaby, Guilherme, Luciana, Paula, Rodolfo e Sheila, pelos momentos de descontração e diversão.

Ao Lucas, por toda dedicação, paciência e amor durante os dois anos de mestrado.

Aos Professores Cláudia, Marcelo e Mônica Pinho, que não são apenas professores, mas verdadeiros amigos, por todo o auxílio prestado durante minha permanência no Departamento.

Aos meus amigos e veteranos de mestrado Clarice, Eduardo Bastianetto, Guilherme Lanna, Joana, Moisa, Regina e Valente, por todas as dicas, conversas e auxílio, dentro e fora da Escola de Veterinária.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA), em especial à Maura e ao Miltinho, pela prontidão e boa vontade para me ajudar sempre que precisava.

À Professora Ângela, ao Danilo e ao Professor Miguel por toda atenção e pela ajuda com as análises estatísticas deste trabalho.

Aos demais professores do DTIPOA pelo conhecimento compartilhado e atenção dispensada às minhas dúvidas.

A todos aqueles que de alguma maneira estiveram envolvidos com o projeto, os meus sinceros agradecimentos.

*“Somos o que repetitivamente fazemos,
portanto a excelência não é um feito, mas um hábito.”
Aristóteles*

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 10 |
| RESUMO | 11 |
| ABSTRACT | 11 |
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1. Toxinfecções alimentares | 14 |
| 2.2. O gênero <i>Staphylococcus</i> | 16 |
| 2.2.1. Características do gênero <i>Staphylococcus</i> e seu envolvimento em surtos | 16 |
| 2.2.2. Produção de toxinas | 17 |
| 2.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> | 18 |
| 2.2.4. <i>Staphylococcus intermedius</i> | 19 |
| 2.2.5. <i>Staphylococcus hyicus</i> | 20 |
| 2.3. Meios de cultura para enumeração de <i>Staphylococcus</i> spp. | 21 |
| 2.3.1. Ágar Baird-Parker | 22 |
| 2.3.2. Ágar Baird-Parker – RPF | 23 |
| 2.3.3. Petrifilm™ Staph Express | 25 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| 3.1. Amostragem de leite cru | 27 |
| 3.2. Culturas puras | 27 |
| 3.2.1. Curvas de crescimento | 27 |
| 3.2.2. Preparo do leite | 28 |
| 3.2.3. Inoculação das culturas em leite | 28 |
| 3.2.4. Preparo das diluições | 28 |
| 3.3. Métodos de análise | 29 |
| 3.3.1. Plaqueamento em ágar Baird-Parker (BP) | 29 |
| 3.3.2. Enriquecimento em caldo BHI | 29 |
| 3.3.3. Prova de coagulase | 29 |
| 3.3.4. Plaqueamento em Petrifilm™ Staph Express (PSE) | 29 |
| 3.3.5. Plaqueamento em ágar Baird-Parker – RPF (RPF) | 30 |
| 3.4. Análise estatística | 30 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 31 |
| 4.1. Comparação entre os meios de cultura Baird-Parker, Baird-Parker – RPF e Petrifilm™ Staph Express na detecção de <i>Staphylococcus</i> spp. em amostras de leite cru | 31 |
| 4.2. Comparação entre os meios de cultura Baird-Parker, Baird-Parker – RPF e Petrifilm™ Staph Express na detecção de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. hyicus</i> e <i>S. intermedius</i> inoculados em leite reconstituído esterilizado | 38 |
| 5. CONCLUSÕES | 44 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 44 |
| 7. ANEXO I | 53 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Caracterização das espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivo | 17 |
| Tabela 2. Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. nos meios Petrifilm™ Staph Express (PSE), Baird-Parker (BP) e Baird-Parker – RPF (RPF) | 31 |
| Tabela 3. Contagem de colônias de <i>Staphylococcus</i> spp. nos meios Petrifilm™ Staph Express (PSE), Baird-Parker (BP) e Baird-Parker – RPF (RPF) | 39 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1. Resultado do teste de coagulase das colônias DNase positivo, selecionadas das placas de Petrifilm™ Staph Express | 33 |
| Gráfico 2. Resultado do teste de coagulase das colônias típicas e atípicas crescidas em ágar BP | 37 |
| Gráfico 3. Resultado do teste de coagulase das colônias típicas em ágar RPF | 38 |
| Gráfico 4. Curva de crescimento de <i>Staphylococcus intermedius</i> | 39 |
| Gráfico 5. Curva de crescimento de <i>Staphylococcus hyicus</i> | 39 |
| Gráfico 6. Curva de crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> | 40 |
| Gráfico 7. Percentual de colônias, total e por espécie de <i>Staphylococcus</i> , associadas ao halo róseo nas placas de Petrifilm™ Staph Express | 42 |
| Gráfico 8. Percentual de colônias típicas total e por espécie de <i>Staphylococcus</i> apresentando características típicas no ágar Baird-Parker | 43 |
| Gráfico 9. Percentual de colônias coagulase-positivo total e por espécie de <i>Staphylococcus</i> apresentando características típicas no ágar Baird-Parker – RPF | 44 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Colônias típicas de <i>Staphylococcus aureus</i> em ágar Baird-Parker | 23 |
| Figura 2. Colônias coagulase positivo e negativo de <i>Staphylococcus intermedius</i> em ágar Baird-Parker – RPF | 24 |
| Figura 3. Colônias DNase positivo de <i>Staphylococcus hyicus</i> em Petrifilm™ Staph Express | 26 |
| Figura 4. Esquema de inoculação e plaqueamento de culturas puras de <i>Staphylococcus</i> spp. | 28 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| DTA's | Doenças Transmissíveis por Alimentos |
| MS | Ministério da Saúde |
| ANVISA | Agência de Vigilância Sanitária |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| SE | Enterotoxina estafilocócica |
| TSST-1 | Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico |
| UFC | Unidades formadoras de colônias |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| IN | Instrução Normativa |
| BP | Ágar Baird-Parker |
| RPF | Ágar Baird-Parker – RPF (<i>rabbit plasma fibrinogen</i> – fibrinogênio e plasma de coelho) |
| PSE | Petrifilm™ Staph Express |
| DNase | Desoxirribonuclease |
| AOAC | <i>Association of Official Analytical Chemistry</i> |
| BHI | Caldo <i>Brain and Heart Infusion</i> (infusão de cérebro e coração) |

RESUMO

A metodologia de referência para a enumeração de *Staphylococcus* spp. recomenda o uso do ágar Baird-Parker. No entanto, outros meios diagnósticos, que fornecem resultados mais rapidamente, como o ágar Baird-Parker – RPF e o Petrifilm™ Staph Express Count Plate (3M Microbiology Products, St. Paul, EUA), também estão disponíveis no mercado. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar a eficiência destes meios na enumeração de *Staphylococcus* spp. em leite cru e em leite esterilizado inoculado com culturas puras de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius* em três diferentes concentrações (10^7 , 10^4 e 10^2 UFC/mL), com seis repetições para cada tratamento. As contagens médias obtidas na enumeração de *Staphylococcus* spp. com o uso do PSE (2,50 Log₁₀ UFC/mL) foram menores ($p < 0,05$) que as encontradas nos ágar BP (4,12 Log₁₀ UFC/mL) e RPF (3,86 Log₁₀ UFC/mL), sendo que as contagens nesses meios foram iguais ($p > 0,05$). As contagens médias no PSE das três espécies de *Staphylococcus* inoculadas em leite esterilizado foram diferentes ($p < 0,05$) daquelas obtidas com o ágar BP, entretanto, foram semelhantes ($p > 0,05$) nos ágar BP e RPF. Dessa forma, a substituição do ágar BP pelo ágar RPF demonstra ser viável, sem alteração da acurácia dos resultados.

Palavras chave: leite cru, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, ágar Baird-Parker, ágar Baird-Parker – RPF, Petrifilm™ Staph Express

ABSTRACT

The reference methodology for *Staphylococcus* spp. enumeration recommends the use of the Baird-Parker agar (BP). However, others culture media may produce results in a shorter time, as Baird-Parker - RPF agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and the Petrifilm™ Staph Express Count Plate - PSE - (3M Microbiology Products, St. Paul, USA). Thus, this work was carried out in order to compare the efficiency of the fore cited culture media for the enumeration of *Staphylococcus* spp. in raw milk and sterilized milk. The latter was inoculated with pure cultures of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, and *Staphylococcus intermedius* in three different concentrations (10^7 , 10^4 , and 10^2 CFU/mL) with six repetitions for each treatment. Mean *Staphylococcus* spp. count obtained by PSE (2.50 Log₁₀ CFU/mL) was lower ($p < 0.05$) from those obtained by BP (4.12 Log₁₀ CFU/mL) and RPF (3.86 Log₁₀ UFC/mL) agars, being the latter two values considered similar ($p > 0.05$). The mean counts in PSE for the enumeration of the three *Staphylococcus* species inoculated in sterilized milk were different ($p < 0.05$) of those obtained in BP, however, they were similar ($p > 0.05$) in BP and RPF agars. Therefore, the replacement of the BP by the RPF can be viable without altering the accuracy of the analysis.

Keywords: raw milk, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, Baird-Parker agar, Baird-Parker - RPF, Petrifilm™ Staph Express

1. INTRODUÇÃO

Doenças transmissíveis por alimentos são afecções transmitidas pelos alimentos e água, causadas pela contaminação microbiana destes, pela produção de toxinas por estes microorganismos ou, ainda, pela contaminação por substâncias tóxicas. Existem mais de 250 tipos de doenças transmissíveis por alimentos descritos, como botulismo, salmonelose, cólera, dentre outros, os quais ocorrem em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento (Le Loir *et al.*, 2003). Apesar da alta prevalência, os casos destas afecções são pouco relatados devido a fatores como falta de conhecimento por parte da população, falhas dos sistemas de inspeção e saúde e mudanças de hábitos alimentares.

Dos microorganismos causadores das toxinfecções alimentares, as bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* possuem elevada relevância, devido à sua capacidade de sobrevivência no meio e à produção de inúmeras toxinas, dentre elas as enterotoxinas e a toxina-1 da síndrome do choque tóxico. As espécies de *Staphylococcus* são bem adaptadas aos animais homeotérmicos e algumas apresentam íntima associação com os hospedeiros, como por exemplo, o *Staphylococcus hyicus* e suínos e o *Staphylococcus intermedius* e os cães. No entanto, outras espécies são amplamente disseminadas, das quais se destaca o *Staphylococcus aureus*, que é encontrado desde o fundo do mar até nos animais terrestres. No homem, esta espécie é encontrada na maioria da população, presente nas narinas, pele e pêlos, sendo responsável por diversas doenças, especialmente as toxinfecções alimentares (Baird-Parker, 1990).

Devido às suas características, os *Staphylococcus* spp. exibem uma alta capacidade de contaminação e produção de

toxinas nos alimentos, expondo a população consumidora ao risco de desenvolvimento de uma toxinfecção alimentar. Por isso, as legislações mundiais que versam sobre os parâmetros microbiológicos de alimentos preconizam a pesquisa de estafilococos coagulase-positivo, pois esta enzima apresenta correlação com a produção de toxinas. Contudo, já foi demonstrada por diversos pesquisadores a produção destes metabólitos por espécies coagulase-negativo.

Para pesquisa de *Staphylococcus* spp. existem diversos meios de cultura, cada um com suas particularidades, desenvolvidos por diversos pesquisadores. Entretanto, a metodologia mais utilizada pelos laboratórios emprega o ágar Baird-Parker, meio desenvolvido por um pesquisador de mesmo nome e que permite a recuperação de células injuriadas. Ao longo do tempo, foram desenvolvidos outros métodos que tomam como base o ágar Baird-Parker, visando melhorar a sensibilidade e especificidade deste, bem como reduzir o tempo requerido para análise. Destes meios, o ágar Baird-Parker com plasma de coelho (Baird-Parker – RPF) e o Petrifilm™ Staph Express são adaptações do meio original que possibilitam a realização de análises de alimentos de forma mais rápida, em detrimento de suas características especiais, sendo reconhecidos como métodos oficiais de análise pela Comunidade Européia e pelos Estados Unidos da América.

Dessa forma, considerando a alta incidência de toxinfecções promovidas pela ingestão de alimentos contaminados com *Staphylococcus* spp. e enterotoxinas pré-formadas no alimento, assim como a necessidade do uso de métodos mais rápidos necessários para sua detecção, este trabalho teve como objetivo comparar a eficiência dos meios Baird-Parker, Baird-Parker – RPF e Petrifilm™ Staph Express na enumeração de *Staphylococcus* spp. em leite cru e em leite esterilizado, inoculado com culturas

puras de *Staphylococcus* spp. em três concentrações. A partir dos resultados obtidos, será possível a adoção de uma metodologia mais rápida para detecção destas espécies enterotoxigênicas em leite.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Toxinfecções alimentares

As toxinfecções alimentares são afecções amplamente disseminadas pelo mundo e se originam do consumo de alimentos ou água contaminados por microorganismos e por suas toxinas pré-formadas, ou ainda por substâncias químicas tóxicas, *prions* e metais pesados. Dentre os fatores que contribuem para a toxinfecção alimentar, destacam-se as mudanças na produção dos alimentos e das características demográficas de certas regiões; a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; as falhas nos sistemas de inspeção, conservação e distribuição; a rápida veiculação internacional de produtos industrializados e a mudança de hábitos alimentares, dentre outros (Carmo *et al.*, 2005).

Diversos gêneros de microorganismos podem causar estas toxinfecções, como por exemplo: *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Listeria*, *Bacillus*, dentre outros (Carmo e Bergdoll, 1990). No entanto, a toxinfecção estafilocócica é um dos tipos mais prevalentes no mundo, sendo caracterizada por sintomas como vômito, diarreia e dores abdominais, os quais aparecem entre uma e seis horas após a ingestão dos alimentos (Pereira *et al.*, 1996). A duração é curta, permanecendo por 24 a 48 horas, e a recuperação completa ocorre usualmente em um a três dias. A toxinfecção estafilocócica é normalmente branda, autoimitante, com baixa taxa de mortalidade (Holmberg e Blake, 1984). Manipulação em más condições higiênico-sanitárias e aquecimento do alimento em temperaturas inadequadas favorecem o crescimento do

microorganismo e a síntese de enterotoxinas estafilocócicas (Sena *et al.*, 1999).

Entre os alimentos que mais freqüentemente apresentam-se envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar, destacam-se as carnes bovina e de frango, responsáveis principalmente pela veiculação de *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Enterobacteriaceae* (Johnston, 1990). Em seguida, aparece a maionese caseira que, quando fabricada com ovos contaminados, atua como principal veiculador de *Salmonella* (Perales e Garcia, 1990). O queijo ocupa um lugar de destaque entre os alimentos incriminados em surtos de toxinfecção, veiculando em maior freqüência *Staphylococcus* (Sabioni *et al.*, 1994; Pinto *et al.*, 1996). O leite merece referência como responsável por surtos de gastroenterite devido à sua composição rica em nutrientes e, por ser muitas vezes consumido *in natura*, veiculando principalmente *Staphylococcus* e suas toxinas pré-formadas (Germano *et al.*, 1993). Dentre os alimentos comumente associados com toxinfecção estafilocócica estão a carne de bovino, suíno e de frango, assim como seus derivados (presunto, salame e salsicha); saladas (presunto, galinha e batata); produtos de confeitaria e derivados de leite, principalmente o queijo (Jay, 2005).

Um surto de toxinfecção estafilocócica ocorreu na cidade de Passos, Minas Gerais (Brasil), envolvendo 42 pessoas, das quais 31 apresentaram vômito, diarreia e náusea apenas trinta minutos após a refeição. Os alimentos suspeitos foram panqueca de frango, arroz, feijão, molho de tomate e pasta de grão-de-bico preparados no local. Estafilococos enterotoxigênicos foram isolados da panqueca de frango em quantidade acima de $2,0 \times 10^8$ UFC/grama. Na detecção de enterotoxinas, foi constatado que as amostras isoladas dos alimentos eram produtoras das enterotoxinas (SE) A, B e D. Além de amostras de alimentos, também

foram coletados *swabs* das narinas, garganta e leito sub-ungueal de cinco manipuladores de alimentos, dos quais quatro eram portadores de *Staphylococcus aureus* produtores de enterotoxinas A, B, C e D. Além destas, um dos manipuladores também era portador de cepas produtoras da toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1). Estes resultados demonstram a importância dos manipuladores na veiculação de patógenos (Carmo *et al.*, 2003).

A incidência real das toxinfecções é desconhecida por diversas razões, incluindo respostas imprecisas das vítimas às entrevistas realizadas pelos serviços de saúde; erros de diagnóstico devido à similaridade dos sintomas em relação a outras doenças; coleta inadequada de amostras para análise laboratorial e exames laboratoriais impróprios (Bennett, 1986, citado por Newsome, 1988). Devido às falhas ocorrentes nos serviços de vigilância epidemiológica e à falta de conscientização da população frente às doenças veiculadas por alimentos, apenas uma pequena porcentagem do número real de surtos de toxinfecções alimentares são confirmados. Os resultados encontrados por Wheeler *et al.* (1999) ao realizarem um estudo para estabelecimento da incidência e etiologia de doenças intestinais infecciosas na Inglaterra, mostram que estas afecções ocorrem em uma a cada cinco pessoas por ano e, que para cada caso notificado ao serviço nacional de vigilância, há 1,4 resultado laboratorial positivo, 6,2 casos com amostras de fezes enviadas para investigação, 23 casos analisados por clínicos gerais e 136 casos de doentes na população.

Os principais locais de ocorrência de surtos são os domicílios. Dados do Ministério da Saúde mostram que, dos 3.737 surtos notificados de 1999 a 2004, 48,5% aconteceram em residências, seguidas de restaurantes (18,8%) e escolas (11,6%)

(Carmo *et al.*, 2005). Segundo Van Amson *et al.* (2006), a ausência de programas de educação em segurança alimentar dirigidos à população contribui para estas estatísticas, pois a maioria dos consumidores desconhece os requisitos necessários para a correta manipulação e armazenamento de alimentos, além de não possuírem informações sobre os riscos e perigos associados aos alimentos contaminados.

De acordo com Carmo *et al.* (2005), os dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do Ministério da Saúde mostram a ocorrência de 3.410.048 internações por doenças transmitidas por alimentos (DTA's) de 1999 a 2004, com média de 568.341 casos/ano, sendo que as regiões Norte e Nordeste detêm as maiores taxas de incidência. Os mesmos autores citam também dados do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), que demonstram a ocorrência de 25.581 óbitos por DTA's de 1999 a 2002, com média de 6.320 óbitos/ano.

O levantamento do Sistema Único de Saúde (SUS) revelou que o custo médio por internação foi de R\$ 471,59 e que aconteceram 219 surtos no ano de 2000, com 1.000 pessoas hospitalizadas e uma estimativa de 8.663 doentes nesta data, no Estado do Paraná. Por sua vez, os dados do Hospital de Clínicas de Curitiba (PR) indicam que o internamento de pessoas acometidas por toxinfecções alimentares oferece um custo de R\$ 1.870,00, quantia que, quando multiplicada pelo número de pacientes hospitalizados, alcança o valor de R\$ 1.870.000,00 gastos pelo governo somente em internações devido às DTA's (Van Amson *et al.*, 2006). No Brasil, os custos com os casos internados por DTA's de 1999 a 2004 chegaram a R\$ 280 milhões, com média de R\$ 46 milhões por ano (Carmo *et al.*, 2005).

2.2. O gênero *Staphylococcus*

2.2.1. Características do microorganismo e seu envolvimento em surtos

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* e se apresenta morfológicamente como cocos Gram-positivo, com 0,5 a 1,5 micrômetros de diâmetro, podendo ocorrer como células simples, aos pares ou em tétrades; anaeróbios facultativos, catalase-positivo, imóveis e não esporulados (Kloss e Schleifer, 1994). O gênero é subdividido em 32 espécies e 15 subespécies. Os estafilococos coagulase-positivo, segundo a classificação proposta por Kloss (1990), foram divididos em quatro espécies principais: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus delphini*. Os estafilococos coagulase-negativo foram subdivididos em mais de dez espécies, dentre elas: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus warneri* (Carmo, 1997; Kloss, 1990). Algumas características das espécies coagulase-positivo estão descritas na tabela 1.

As espécies do gênero *Staphylococcus* são mesófilos típicos, apresentando temperatura ótima para crescimento de 35°C, embora possam crescer entre 10 e 45°C. A variação de pH que permite crescimento do agente é de 4,2 a 9,3, embora o pH ótimo esteja entre 7,0 e 7,5 (Kloss e Schleifer, 1994). *Staphylococcus* spp. crescem bem em alimentos com atividade de água de 0,83, valor bastante baixo para a maioria dos microorganismos (Adams e Moss, 1997), sendo a atividade de água ótima para seu crescimento e produção de enterotoxinas de 0,99 (Bergdoll, 1990).

Amplamente disseminados no ambiente, diversas espécies pertencentes ao gênero

Staphylococcus estão presentes na pele e mucosas de mamíferos, sendo que a maioria dos portadores encontra-se na condição de assintomáticos. Portanto, seres humanos e outros animais podem veicular os microorganismos para os alimentos, com atenção especial para o leite e seus derivados, visto que vários fatores como uso de ordenha manual, falhas na higiene dos animais e equipamentos, bem como ausência de programas de controle de mastite, ainda ocorrem em muitos rebanhos (Cardoso *et al.*, 1999). Outros fatores, como problemas na higienização de equipamentos e de mãos e antebraços de funcionários, no controle do binômio tempo-temperatura nas indústrias, assim como a manutenção da cadeia do frio desde a produção até o consumo dos alimentos e a produção de derivados com leite cru, também contribuem para a contaminação dos produtos lácteos (Assumpção *et al.*, 2003).

As toxinfecções alimentares por estafilococos são causadas, predominantemente, pelas cepas coagulase-positivo. O agente causador da intoxicação não é o microorganismo em si, mas a enterotoxina liberada no alimento durante seu desenvolvimento (Bergdoll, 1990). O *S. aureus* é a espécie enterotoxigênica mais comumente envolvida em casos de toxinfecção alimentar, sendo usual encontrar na indústria apenas este grupo de estafilococos coagulase-positivo. No entanto, outras espécies de estafilococos, como *S. intermedius* e *S. hyicus*, também são produtoras de coagulase e têm potencial para a produção de enterotoxinas (Jablonski e Bohach, 1997).

Tabela 1. Caracterização das espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivo

| Característica | <i>Staphylococcus</i> | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|--------------------|---------------|-----------------|
| | <i>aureus</i> | <i>aureus</i> ssp. <i>anaerobius</i> | <i>intermedius</i> | <i>hyicus</i> | <i>delphini</i> |
| Pigmento | ⊕ | - | - | - | - |
| Crescimento aeróbio | + | ⊕ | + | (+) | + |
| Crescimento anaeróbio | + | + | (+) | (+) | (+) |
| Coagulase ^a | + | + | + | D | + |
| Clumping Factor ^b | + | - | D | - | - |
| TNase | + | + | + | + | ⊖ |
| Hemolisinas ^c | + | + | D | - | + |
| Catalase | + | ⊖ | + | + | + |
| Produção de acetoína | ⊕ | - | - | - | - |
| Redução de nitrato | + | - | + | + | + |
| Fermentação aeróbica de manitol | + | + | (D) | □ | (+) |
| Fermentação anaeróbica de manitol | ⊕ | - | - | - | - |

Fonte: Adaptado de Kloss, 1990.

a: coagulase livre; b: coagulase ligada; c: ágar sangue de carneiro

+ : 90% ou mais cepas positivo; - : nenhuma ou menos que 10% positivo; ± : 90% ou mais cepas fracamente positivo

D: 11 a 89% positivo

(): reação retardada

O: características chave

Embora a enumeração de estafilococos coagulase-positivo em alimentos não seja muito específica, ela tem demonstrado ser um indicador efetivo do grau de contaminação com possíveis amostras patogênicas, particularmente de fontes humanas (Desmarchelier *et al.*, 1999). A Resolução RDC número 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), legislação vigente que estabelece os padrões microbiológicos de alimentos (Brasil, 2001), instituiu a pesquisa de estafilococos coagulase-positivo em substituição à pesquisa de *S. aureus* em decorrência do risco à saúde pública representado também pelas demais espécies produtoras de toxinas. Contudo, alguns estudos mostram a produção de toxinas por espécies coagulase-negativo (Hoover *et al.*, 1983; Bautista *et al.*, 1988; Carmo *et al.*, 2002), o que incita a possibilidade de mudanças na legislação devido à ameaça representada por estes microorganismos.

2.2.2. Produção de toxinas

Durante seu crescimento nos produtos de origem animal, as amostras enterotoxigênicas de *Staphylococcus* spp. produzem as enterotoxinas (SE), um grupo de proteínas de baixo peso molecular, termoestáveis, pepsina-resistentes, similares na composição e atividade biológica. Entretanto, são identificadas como proteínas distintas devido à diferença de antigenicidade entre si (Casman *et al.*, 1963). Foram identificadas, sorologica e genotipicamente, diversas enterotoxinas estafilocócicas que são nomeadas como SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE, SEG, SEH (Park *et al.*, 1996; Pereira *et al.*, 1996; Su e Wong, 1996), SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN e SEO (Jarraud *et al.*, 2001a,b; Orwin *et al.*, 2001; Carmo, 2008¹). De acordo com Eley (1992), os tipos de

¹Comunicação pessoal

toxinas frequentemente envolvidos em toxinfecções alimentares são a enterotoxina estafilocócica A (SEA), seguida da enterotoxina SED. Estudos indicam que 100 a 200 ng de SEA podem produzir sintomas de intoxicação (Evenson *et al.*, 1988).

Além da produção de enterotoxinas, algumas cepas *S. aureus* podem sintetizar diversas exotoxinas, das quais se destaca a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1). Esta toxina foi inicialmente identificada como enterotoxina F (SEF) (Bergdoll *et al.*, 1981), mas foi renomeada após ser purificada, pois não apresentou as características típicas das enterotoxinas, que são induzir resposta emética em macacos *rhesus* e possuir dois resíduos de cisteína em sua constituição (Bergdoll, 1997). Esta toxina possui características que lhe tornam peculiar pois apresenta percentual elevado de aminoácidos hidrofóbicos, mas tem excelente solubilidade em água; é termoestável, mantendo sua atividade biológica mesmo após ser fervida por uma hora; e é resistente à clivagem por tripsina (Dinges *et al.*, 2000). Dessa forma, é classificada como um superantígeno e estimula a produção de substâncias envolvidas diretamente na síndrome do choque tóxico (Bergdoll, 1997).

A produção dessas toxinas representa um risco potencial à saúde pública, pois caso aconteça a sua ingestão juntamente com os alimentos, poderá ocorrer um quadro de gastroenterite aguda. Uma população de pelo menos $5,0 \times 10^5$ células de *S. aureus*/g de alimento, geralmente é necessária para que haja a produção de quantidade suficiente de enterotoxina para causar intoxicação (Park e Szabo, 1986; Newsome, 1988). Entretanto, já foi constatada por Carmo *et al.* (2002) a produção de toxinas em contagens de $2,4 \times 10^3$ UFC/mL, o que aumenta os riscos de intoxicação estafilocócica, demonstrando a constante necessidade de implantação de boas práticas de fabricação. Asao *et al.* (2003) relataram um surto de

intoxicação estafilocócica ocorrido no ano 2000, no distrito de Kansai (Japão), onde 13.420 pessoas que costumavam consumir produtos lácteos, incluindo leite semi-desnatado e bebida láctea, elaborados por uma fábrica localizada na cidade de Osaka, foram acometidas. Dentre os produtos lácteos, o principal ingrediente era leite em pó desnatado produzido em um laticínio em Hokkaido, uma ilha ao norte do país. A enterotoxina estafilocócica A (SEA) foi detectada no leite semi-desnatado em quantidade inferior a 0,38 ng/mL e, no leite em pó desnatado em aproximadamente 3,7 ng/g. A ingestão de SEA *per capita* foi estimada em 20 – 100 ng. Segundo os autores, assumindo que a produção de SEA se deu antes da pasteurização, a mesma foi submetida ao aquecimento, mas manteve as atividades imunológica e biológica, embora tenha sido parcialmente inativada.

2.2.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus pode ser destacado dentre as bactérias passíveis de serem encontradas no leite devido à sua ubiquidade na natureza, sua elevada prevalência como agente etiológico da mastite bovina e ao baixo nível sócio-econômico dos ordenhadores, muitas vezes portadores assintomáticos do microorganismo e possuidores de maus hábitos de higiene (Gomes e Gallo, 1995). Feridas infectadas, lesões e abscessos nas mãos dos manipuladores também podem ser fontes de contaminação, assim como tosse e espirros de indivíduos com infecções respiratórias. De acordo com Bergdoll (1989), cerca de um terço a metade das cepas de *S. aureus* tem mostrado ser enterotoxigênico e, aproximadamente, 30 – 50% dos humanos são portadores deste microorganismo. Desse modo, esta bactéria é usada como importante indicador de higiene pessoal, sendo conhecido o seu potencial para produção de perigosas enterotoxinas (Edwards *et al.*, 2001).

S. aureus ocorre ainda na pele e couro dos animais e pode contaminar os alimentos originários dos mesmos como resultado de contaminação cruzada durante o abate (Newsome, 1988), bem como antes e durante a ordenha, uma vez que a prevalência e a relevância deste microorganismo como causador de infecções intramamárias são bem conhecidas (Jablonski e Bohach, 1997). Adesiyun *et al.* (1998) conduziram um estudo para determinar a prevalência de *S. aureus* em amostras de leite de diferentes propriedades. As contagens em amostras de leite de tanque de refrigeração variaram de $5,9 \times 10^3$ a $1,2 \times 10^5$ UFC/mL e de $2,4 \times 10^3$ a $3,0 \times 10^4$ UFC/mL nas amostras individuais dos animais. Das 105 cepas de *S. aureus* isoladas das amostras de leite de tanque neste trabalho, 45 (42,9%) eram enterotoxigênicas, produzindo SEA, SEB, SEC e SED separadamente ou em combinação.

O melhor crescimento de *S. aureus* ocorre sob condições de aerobiose em presença de aminoácidos e vitaminas (Bergdoll, 1989). O crescimento do microorganismo e a produção de enterotoxinas são eventos dependentes de fatores como pH, temperatura, condições de aerobiose, atividade de água (a_w) e presença de outros microorganismos, segundo Bergdoll (1990). Este microorganismo tolera a presença de sal (NaCl) até 20%; no entanto, seu crescimento pode ser reprimido na presença de outras bactérias competidoras no meio. Quanto à resistência térmica, são microorganismos termolábeis, sendo inativados em temperaturas superiores a 60°C por três minutos (Bergdoll, 1989).

Em 1984, foi relatado por Merrill *et al.* um episódio de toxinfecção estafilocócica envolvendo 300 crianças dentre 850 que participaram da procura por ovos de Páscoa, escondidos no jardim de uma igreja de uma cidade norte-americana. A contaminação dos ovos de galinha cozidos com casca foi por *S.*

aureus enterotoxigênico produtor de SEB, isolado de lesões da pele do cozinheiro responsável pelo cozimento e tingimento dos ovos. Sabioni *et al.* (1994) investigaram um surto de toxinfecção alimentar em Ouro Preto, MG, oriundo da ingestão de queijo Minas. Neste surto, 11 casos foram relatados, dos quais três tiveram de ser hospitalizados. Os resultados das análises microbiológicas revelaram um elevado nível de coliformes fecais, o que indica contaminação de origem fecal, e a presença de *S. aureus* na ordem de 10^8 UFC/g, sendo que uma população de 10^6 UFC/g em alimentos implica em alto risco de toxinfecção.

2.2.4. *Staphylococcus intermedius*

Ao contrário do *S. aureus*, estão disponíveis apenas escassas informações sobre a produção de enterotoxinas por *Staphylococcus intermedius* e outros estafilococos. Descrita em 1976 por Hájek, esta espécie apresenta características semelhantes àquelas do *S. aureus* e do *S. epidermidis*, o que deu origem ao nome do microorganismo (Hájek, 1976). Hoje é reconhecida, essencialmente, como componente normal da microbiota cutânea, oral e nasal de cães saudáveis, embora possa ser um patógeno invasivo. Segundo Roberson *et al.* (1996), poucos estudos mostram a prevalência deste microorganismo como causador de mastite. Ao avaliar a prevalência de *S. hyicus* e *S. intermedius* nas infecções intramamárias de 22 rebanhos leiteiros, os autores supracitados encontraram uma prevalência de 0,2% (1/487) de *S. intermedius*, concluindo que este não parece ser um patógeno de importância nas infecções intramamárias.

Em humanos, *S. intermedius* é raramente isolado, no entanto há relatos de infecções invasivas em pacientes imunossuprimidos e contaminação de feridas por esta bactéria (Talan *et al.*, 1989a). Na tentativa de isolar o

microorganismo de pessoas que tinham contato com cães, Talan *et al.* (1989b) encontraram frequência de 0,7% (1/144), indicando que o microorganismo é realmente um patógeno zoonótico, ao contrário do *S. aureus*. Dessa maneira, cepas enterotoxigênicas de *S. intermedius* podem contaminar produtos alimentícios durante a manipulação e processamento via contatos animais-humanos (Almazan *et al.*, 1987; Becker *et al.*, 2001).

Alguns estudos mostraram evidências de produção de exotoxinas, como a β -toxina e enterotoxinas A e C (Dziewanowska *et al.*, 1996), além de α e δ -hemolisinas, proteína A e enzimas proteolíticas (Almazan *et al.*, 1987) por *S. intermedius*, revelando o potencial enterotoxigênico desta espécie. Becker *et al.* (2001) analisaram 292 amostras de *S. intermedius*, 281 oriundas de diferentes espécies animais e 11 isoladas de humanos, visando à identificação de genes codificadores de enterotoxinas por meio da técnica de PCR. Em 33 amostras, foi detectado o gene para produção de enterotoxina C, sendo que a produção desta substância foi obtida *in vitro* em 30 amostras.

Em um estudo para pesquisar a enterotoxigenicidade de *S. intermedius* originários de cães, Hirooka *et al.* (1988) avaliaram 73 amostras de estafilococos coagulase-positivo isolados de piodermatite de cães em Londrina (PR), classificando-as conforme a espécie e analisando a produção de enterotoxinas A – E. Houve produção de enterotoxinas por 13 das 52 amostras classificadas como *S. intermedius* e de TSST-1 por três amostras do microorganismo, sendo uma em combinação com SEA e SEC.

Khambaty *et al.* (1994) relataram o primeiro surto de toxinfecção alimentar causado por *S. intermedius* produtor de enterotoxina A (SEA). Este surto, ocorrido em outubro de 1991, envolveu cerca de 256 casos em nove

condados dos estados da Califórnia e Nevada (EUA), tendo como fonte um creme à base de manteiga. Os estafilococos foram isolados de dez amostras dos produtos incriminados e de cinco espécimes clínicos obtidas dos pacientes. Os dados obtidos por este trabalho mostraram uma significativa heterogeneidade, não apenas entre membros de diferentes espécies de *Staphylococcus*, mas também entre membros da mesma espécie e até de mesmo tipo de enterotoxina. Borelli *et al.* (2006) ao investigar a presença de *Staphylococcus* durante a produção do queijo artesanal da Serra da Canastra (MG), isolaram duas amostras de *S. intermedius* produtoras de SEB e SEC, originárias do leite e do fermento láctico natural, também conhecido como pingo.

2.2.5. *Staphylococcus hyicus*

Inicialmente classificado como *Micrococcus hyicus* por Sompolinsky (1953) ao ser isolado da pele de suínos acometidos por epidermite exudativa, este microorganismo foi posteriormente nomeado como *Staphylococcus hyicus* por Devriese *et al.* (1978). Esta espécie é composta por duas subespécies, *hyicus* e *chromogenes*, sendo comumente encontrada na pele de suínos e aves, bem como na microbiota de cabras, vacas e ovelhas, além de ser isolado do úbere destes animais com mastite clínica e sub-clínica (Stamford *et al.*, 2006). As cepas pertencentes à subespécie *hyicus* são termonuclease positiva e apresentam um perfil coagulase variável, uma vez que possuem amostras coagulase positivo e negativo, enquanto aquelas pertencentes à outra subespécie são coagulase e termonuclease negativos (Devriese e Derycke, 1979)

A prevalência de *S. hyicus* em rebanhos leiteiros não é conhecida, pois poucos estudos avaliam a presença deste patógeno nos animais. No estudo realizado para determinar a prevalência de *S. hyicus* e *S. intermedius* nas infecções intramamárias de

22 rebanhos leiteiros, Roberson *et al.* (1996) encontraram uma prevalência de 17,7% (86/487) de *S. hyicus* coagulase-positivo. De 46 animais, 10 obtiveram culturas positivas consecutivas para a bactéria mais de uma vez, levando a uma prevalência de 22%, sendo que destes, quatro apresentaram infecção durante toda a lactação. Estes dados demonstram que a prevalência do microorganismo como agente causal de mastites é baixa; no entanto, o mesmo induz a infecções crônicas de baixa gravidade.

Adesiyun *et al.* (1984) demonstraram a produção de outras enterotoxinas, que não as enterotoxinas estafilocócicas A, B, C, D e E, em um estudo no qual *S. hyicus* originou uma resposta emética em macacos. Esta resposta também foi obtida por Hoover *et al.* (1983) ao avaliar a enterotoxigenicidade de amostras do microorganismo e o perigo por ele representado quando presente em alimentos. Pesquisando a enterotoxigenicidade de 342 cepas de estafilococos isoladas de diferentes partes do corpo de cabras sadias, Valle *et al.* (1990) encontraram duas cepas de *S. hyicus* coagulase-positivo produtoras de SEC.

A produção de SEA, SEB, SEC e SED e de TSST-1 pelo *S. hyicus* também foi verificada por Borelli *et al.* (2006) em amostras de leite e queijo artesanal. Analisando amostras de leite cru estocado em tanques refrigeradores de 80 propriedades em Minas Gerais, Lamaita (2003) encontrou uma frequência de 22,7% de *S. hyicus*, indicando a possibilidade de ocorrência de surtos de toxinfecção causados por este patógeno.

Considerando-se as características e patogenicidade das espécies de *Staphylococcus* spp., é necessária a adoção de medidas que garantam a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos, principalmente do leite e seus derivados. Para isso, se faz necessária a identificação e caracterização genotípica de patógenos envolvidos em surtos, para melhor

desenvolvimento de pesquisas, gerando bases para a realização de medidas de controle (Veras, 2004).

2.3. Meios de cultura para enumeração de *Staphylococcus* spp.

O método de referência (Cunniff, 1995) para enumeração de *S. aureus* é a contagem em placas contendo ágar Baird-Parker, que permite o isolamento e a enumeração de microorganismos injuriados sem a etapa de enriquecimento não seletivo (Marshall, 1992), apresentando como desvantagem, o fato de não ser totalmente seletivo, característica já percebida por diversos autores (Isigdi *et al.*, 1989; Ollis *et al.*, 1995; De Buyser *et al.*, 1998; Zangerl, 1999). Por tal razão, a detecção de *S. aureus* em amostras de leite cru e derivados, que estejam muito contaminadas por microorganismos competidores, é limitada neste meio.

De acordo com a Instrução Normativa (IN) 62 (Brasil, 2003), a enumeração de *Staphylococcus* spp. deve ser feita em ágar Baird-Parker, com realização subsequente da prova de coagulase e de testes complementares. Utilizando-se esta metodologia, são necessários quatro dias de análise para obtenção dos resultados, visto que a amostra permanece no Baird-Parker por dois dias, um dia no caldo BHI e outro no teste da coagulase. Em contrapartida, as análises realizadas com uso de Baird-Parker – RPF ou Petrifilm™ Staph Express fornecem os resultados em 24 horas, o que permite maior agilidade na adoção de medidas corretivas e preventivas, a fim de evitar que alimentos contaminados sejam consumidos pela população.

O método de Número Mais Provável (NMP) de *S. aureus* também é reconhecido como método oficial pela IN 62, o qual é aplicado em amostras de alimentos nas quais os limites de aceitação determinados pela legislação encontram-se abaixo de 100

UFC/g ou mL. Este método baseia-se na inoculação das diluições desejadas das amostras sob teste em caldo telurito manitol glicina segundo Giolitti e Cantoni (caldo GC) , ou caldo soja triptona com sal 10%-piruvato de sódio 1% (TSB-NP), com posterior confirmação em ágar Baird Parker (Brasil, 2003).

2.3.1. Ágar Baird-Parker

O ágar Baird-Parker foi desenvolvido pelo pesquisador A. C. Baird-Parker, a partir do meio de Zebovitz, Evans e Niven Jr. (1955), composto basicamente por telurito e glicina. O ágar final, contendo gema de ovo, telurito de potássio, glicina e piruvato foi, inicialmente, chamado de ETPGA, o que representava as letras iniciais dos nomes dos principais agentes diagnósticos, seletivos e estimuladores em língua inglesa (Baird-Parker, 1962). Com o tempo, foi consagrado o nome ágar Baird-Parker (BP), pelo qual o meio é conhecido hoje. Apesar da eficiência deste meio na recuperação de microorganismos danificados pelos processamentos de alimentos, o mesmo apresentava a desvantagem de não poder ser estocado quando reconstituído, sendo descartado se não utilizado em 24 – 48 horas após o preparo. Para compensar esta desvantagem, Holbrook *et al.* (1969) idealizaram uma versão estável do meio pela modificação do método de preparação, de forma que o piruvato de sódio foi adicionado às placas apenas no momento do uso, por espalhamento na superfície do ágar e secado a 50°C, ou incorporado ao inóculo e seco em temperatura ambiente. As placas puderam

ser estocadas por 28 dias a 4°C, sem perder a seletividade e mantendo desempenho comparável à do meio BP original.

O ágar BP possui propriedades de alto grau de seletividade, uma reação diagnóstica característica e a capacidade de regenerar células injuriadas (Adams e Moss, 1997). De acordo com Aiello e Mays (2001), na composição do meio, o telurito de potássio e o cloreto de lítio atuam como agentes seletivos, inibindo o crescimento da microbiota acompanhante, enquanto o piruvato e a glicina atuam estimulando o crescimento de *S. aureus*. A gema de ovo e o piruvato são responsáveis pela regeneração de células injuriadas e a redução do telurito pelo microorganismo confere às colônias características uma coloração negra, brilhante, rodeada por uma zona clara, resultante da hidrólise da lipovitelina, a proteína da gema de ovo. As colônias também apresentam, com frequência, uma borda interna de cor branca, produzida pela precipitação de ácidos graxos (Adams e Moss, 1997), como mostra a figura 1.

Em um estudo comparando os resultados do ágar BP e das placas de Petrifilm™ Contagem Rápida de *S. aureus* (PFRSA; 3M Microbiology Products, St. Paul, EUA), Schoeller e Ingham (2001) realizaram inoculação experimental de duas concentrações deste microorganismo em amostras de queijo Suíço e *mozzarella*. Os resultados obtidos mostraram uma equivalência entre os dois métodos diagnósticos.



Figura 1. Colônias típicas de *Staphylococcus aureus* em ágar Baird-Parker.

2.3.2. Ágar Baird-Parker – RPF

Outro meio recentemente desenvolvido para a enumeração de *Staphylococcus* spp. é o ágar Baird-Parker – RPF, que contém plasma de coelho e fibrinogênio bovino, permitindo a detecção da atividade da coagulase, e um inibidor de tripsina, o qual evita a fibrinólise total ou parcial dos halos opacos formados em torno das colônias de bactérias coagulase-positivo (Baird-Parker – RPF, 2000). O ágar Baird-Parker com plasma de coelho e fibrinogênio (RPF) foi desenvolvido por Beckers *et al.* (1980; citados por Beckers *et al.*, 1984) como tentativa de reduzir o tempo entre o isolamento e a confirmação da prova de coagulase em tubos, por intermédio de uma metodologia que combinasse os procedimentos de enumeração e confirmação, embora as contagens de *S. aureus* no ágar BP (ETPGA) fossem satisfatórias.

Para isso, os pesquisadores tomaram como base o ágar com plasma de suíno (*Pork*

Plasma Fibrinogen Agar – PPF) desenvolvido por Devoyod *et al.* (1976), no qual uma camada de solução contendo 0,9% de ágar e 20% de plasma de suíno era espalhada por sobre a placa após a inoculação e secagem da amostra na superfície do meio BP, preparado sem adição de gema de ovo. Entretanto, nem todas as preparações de plasma suíno propiciavam a formação de halos de coagulação, apresentando problemas com a visibilidade dos halos de fibrina ao redor das colônias (Beckers *et al.*, 1984).

No ágar RPF, o plasma de suíno foi substituído por plasma de coelho, visto que o primeiro não era comercializado e o segundo era utilizado na prova de coagulase em tubos, padronizada internacionalmente. Em estudo comparando o ágar RPF com o ágar PPF e o meio BP na detecção de *S. aureus* em alimentos naturalmente contaminados, Beckers *et al.* (1984) encontraram resultados semelhantes entre RPF e PPF, enquanto na comparação com o meio BP, os resultados do ágar RPF foram significativamente superiores.

Contudo, Sawhney (1986) notou uma variação na taxa de recuperação de *S. aureus* no meio RPF, além da inibição de algumas cepas pela concentração de telurito de potássio de 0,01% m/v, a qual era utilizada no preparo do ágar Baird-Parker (BP). Para contornar esta inconveniência, o autor realizou experimentos comparando o crescimento e seletividade do ágar BP e RPF, o qual continha diferentes concentrações de telurito de potássio. Os resultados mostraram que a gema de ovo presente no ágar BP apresenta efeito protetor contra o efeito inibitório do telurito e que o RPF apresentou detecção de *S. aureus* superior ao BP quando possuía uma concentração de 0,0025% de telurito, além

de possuir capacidade inibitória para *S. epidermidis* e espécies de *Proteus* equivalente à do outro meio. A partir disso, a concentração de 0,0025% p/v de telurito de potássio passou a ser utilizada na produção do ágar RPF.

No ágar RPF, as colônias apresentam as mesmas características que aquelas demonstradas em ágar BP, com exceção do halo claro, o qual é substituído por uma área opaca de precipitação, o que demonstra a ocorrência de reação positiva de coagulação do plasma presente no meio, conforme mostra a figura 2.

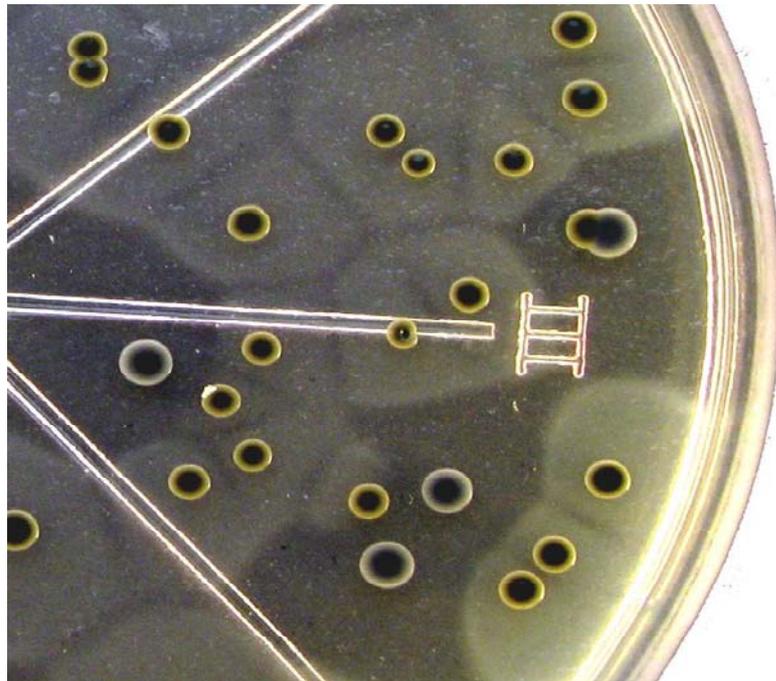


Figura 2. Colônias coagulase-positivo e negativo de *Staphylococcus intermedius* em ágar Baird-Parker – RPF.

Objetivando desenvolver um método econômico e rápido para enumeração de *S. aureus*, Isigdi *et al.* (1989) compararam a recuperação do microorganismo nos meios BP, RPF, o ágar Baird-Parker por Devriese (BPD) e um método de plaqueamento que combinava o meio BP sem emulsão de gema de ovo e telurito e 10% do suplemento indicado por Devriese (1981). De acordo com os resultados, houve um baixo crescimento no RPF comparado aos demais por razões que os pesquisadores não souberam explicar, mas apresentaram como possíveis causas o método de plaqueamento em espiral utilizado, a ausência de gema de ovo, a toxicidade do telurito de potássio sobre as cepas de *S. aureus*, e a presença de colônias de alguns microorganismos contaminantes que, crescendo próximas às colônias coagulase-positivo, podem digerir parcialmente o halo de reação, conforme informações da companhia fabricante do meio usado no estudo.

De Buyser *et al.* (1998) realizaram uma comparação do desempenho dos meios Baird-Parker (BP) e Baird-Parker – RPF na enumeração de estafilococos coagulase-positivo em quatro tipos de queijos produzidos com leite cru, naturalmente contaminados. Analisando os resultados encontrados, os autores recomendam o uso do Baird-Parker – RPF nestes produtos, uma vez que este meio provê resultados similares ou mais precisos que o meio BP, além de possibilitar leitura mais rápida e fácil.

O *European Committee for Standardisation* validou, em 2003, o ágar RPF para a enumeração de *Staphylococcus* coagulase-positivo por meio de um estudo entre diversos laboratórios de 16 países europeus, cujo objetivo era determinar a precisão dos métodos descritos nas normas EN ISO 6888-1, que recomenda o uso do ágar BP, e EN ISO 6888-2, a qual prescreve o uso do RPF (De Buyser *et al.*, 2003). Neste estudo, os meios foram analisados frente a amostras de queijo, carne e ovo em pó, contaminados

artificialmente com amostras de *S. aureus*. Os dados obtidos pelos laboratórios demonstraram que ambos os meios possuem boa precisão no diagnóstico, mas os autores relatam uma melhor eficiência do RPF, o que possibilitou a certificação de equivalência entre as duas partes da norma EN ISO 6888 e instaurou o uso do RPF como método oficial no território europeu.

2.3.3. Petrifilm™ Staph Express

Outro método disponível para enumeração de *S. aureus* é o Petrifilm™ Staph Express Count Plate (3M Microbiology Products, St. Paul, EUA), o qual consiste em um meio de cultura pronto para uso, que contém um agente geleificante solúvel em água, permitindo o crescimento de estafilococos e a inibição da proliferação das demais bactérias. As placas possuem uma versão cromogênica modificada do meio Baird-Parker, que é seletivo e diferencial para *S. aureus*. O Petrifilm™ Staph Express possui, ainda, um disco composto por azul de toluidina e ácido desoxirribonucleico (DNA), usado para identificação de *S. aureus* quando ocorre crescimento de outras bactérias. Para isso, o azul de toluidina reage com a desoxirribonuclease (DNase), enzima produzida pelos microorganismos DNase-positivo, que causa degradação do DNA em oligonucleotídeos, formando halos róseos ao redor da colônia suspeita, o que pode ser observado na figura 3. Deste grupo, os microorganismos detectados na placa de Petrifilm™ Staph Express são *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, os quais correspondem à maioria dos estafilococos coagulase-positivo.

Silbernagel *et al.* (2003), realizaram um estudo colaborativo entre doze laboratórios norte-americanos com o objetivo de avaliar a adoção do Petrifilm™ Staph Express como método oficial de análise, através da comparação deste com o Método Oficial 975.55 da *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC) para enumeração de *S. aureus* em alimentos, o qual utiliza o meio Baird-Parker. Neste estudo, foram analisados cinco alimentos lácteos, sendo os mesmos leite cru, sorvete, iogurte, queijo e soro em pó, contaminados artificialmente com diferentes níveis de inoculação. Os resultados obtidos nas análises feitas com leite cru mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos nos níveis de inoculação. As análises dos demais alimentos também mostraram equivalência entre os métodos, além dos analistas enaltecerem a facilidade e velocidade de uso do Petrifilm™ Staph Express, de forma que este método foi oficializado pela AOAC.

O Petrifilm™ Staph Express também foi validado em território europeu através de um estudo comparativo e interlaboratorial, no qual o novo meio e a norma EN ISO 6888, a qual prevê o uso dos meios Baird-Parker e Baird-Parker – RPF como métodos oficiais para enumeração de *Staphylococcus* spp. em alimentos, foram contrapostos. Neste estudo foram utilizados diferentes produtos de confeitaria, cárneos, lácteos, peixes (seafood), vegetais e derivados de ovos, sendo alguns contaminados artificialmente com *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*. Os resultados encontrados mostraram que o método alternativo apresenta resultados precisos e comparáveis aos dos demais meios, permitindo a detecção de todas as espécies de estafilococos coagulase-positivo. Assim, o Petrifilm™ Staph Express foi considerado método oficial para enumeração de *Staphylococcus* coagulase-positivo em alimentos através da norma ISO 16140 (AFNOR, 2007; 2008).

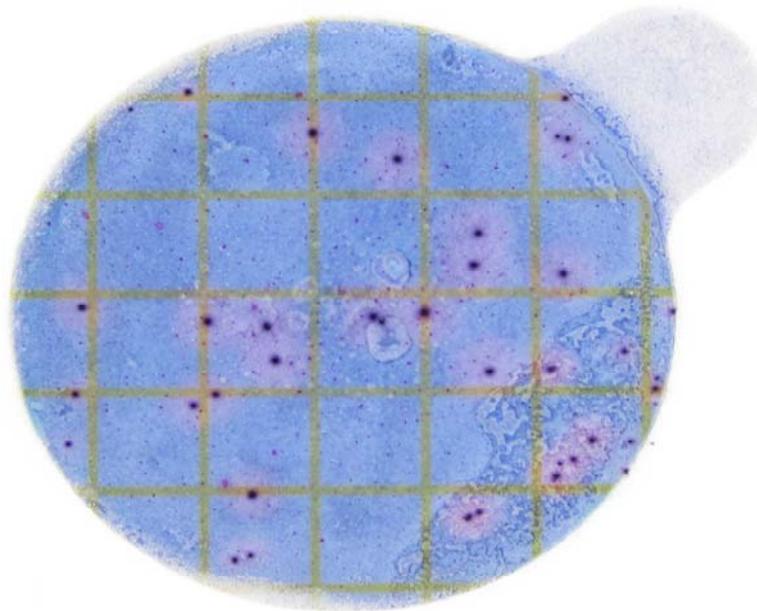


Figura 3. Colônias DNase positivo de *Staphylococcus hyicus* em Petrifilm™ Staph Express.

Silva *et al.* (2005) realizaram quatro experimentos com diferentes objetivos para avaliar o uso do Petrifilm™ Staph Express na detecção de mastites causadas por *S. aureus*. Os resultados obtidos demonstraram potencial uso do Petrifilm™ Staph Express como ferramenta para diagnóstico quando o patógeno de interesse na avaliação do rebanho for *S. aureus*. Segundo os autores, o meio testado apresentou alta sensibilidade, mas a especificidade variou de acordo com os critérios de interpretação e nível de treinamento das pessoas que faziam a leitura das placas, o que exige padronização dos critérios de interpretação para que os resultados alcançados sejam consistentes. Além disso, os mesmos chamam atenção para a necessidade de confirmação dos testes nos quais as zonas róseas se apresentam claras, utilizando, para tal, os métodos padrão quando a situação exigir altas especificidade e sensibilidade.

Tendo como base as informações sobre a incidência de *Staphylococcus* spp. como causadores de mastite e o risco representado pela produção de toxinas, este experimento visa comparar os resultados obtidos pelos meios de cultura Baird-Parker, Baird-Parker – RPF e Petrifilm™ Staph Express na enumeração de *Staphylococcus* coagulase-positivo em leite cru e na detecção de estafilococos coagulase-positivo em amostras de leite em pó reconstituído, inoculado com amostras de *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* em três concentrações, visando a adoção de uma metodologia mais rápida para a detecção da presença deste gênero em leite.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem de leite cru

Foram analisadas trinta e seis amostras de leite cru, oriundas de tanques de refrigeração de diferentes propriedades, coletadas em

frascos esterilizados. Após o procedimento de coleta, os frascos eram acondicionados em caixa isotérmica contendo gelo reciclável, e transportados até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, da Escola de Veterinária da UFMG, onde foram realizadas as análises.

3.2. Culturas puras

A cepa de *S. aureus* utilizada foi a amostra identificada como FRI-361 do *Food Research Institute*, fornecida pelo Dr. Merllin S. Bergdoll, enquanto as cepas de *S. hyicus* e *S. intermedius*, codificadas como Z11 e Z19, respectivamente, foram gentilmente cedidas pelo doutorando Fernando Zocche, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas (RS). As culturas foram mantidas congeladas a -20°C em tubos tipo *ependorff*, contendo 900 µL de caldo *Brain and Heart Infusion* (BHI; Difco, Sparks, EUA) e 100 µL de glicerol.

3.2.1. Curvas de crescimento

Foi realizada curva de crescimento em duplicata para cada espécie de *Staphylococcus* visando estabelecer a dinâmica populacional das três cepas testadas. As culturas foram ativadas em tubos com caldo BHI e incubadas em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 horas. Destes tubos foi transferido 1 mL de cada cultura para um frasco contendo 50 mL de caldo BHI, sendo que após a distribuição inicial do inóculo e agitação do conteúdo, 1 mL foi retirado de cada frasco para a realização das diluições e plaqueamento em ágar Baird-Parker, e os frascos incubados em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. A cada duas horas, o procedimento para plaqueamento das cepas bacterianas era repetido até completar 24 horas de incubação. A partir das médias das

contagens resultantes das curvas de crescimento, foi estipulado o período de incubação em caldo BHI para que a população de 10^9 células/mL, aproximadamente, fosse atingida.

3.2.2. Preparo do leite

O leite em pó desnatado (Difco, Sparks, EUA) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e distribuído em tubos de ensaio, em volume de 9 mL. Os tubos foram acondicionados em cestos e autoclavados a 121°C por 15 minutos, sendo mantidos sob refrigeração até a sua utilização.

3.2.3. Inoculação das culturas em leite

As alíquotas congeladas das culturas eram retiradas do *freezer* e ativadas em caldo BHI, devidamente identificados com o nome da bactéria e a data de inoculação, e incubadas em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, durante o período determinado pelas curvas de crescimento.

Após o período de incubação, o tubo de caldo BHI era retirado da estufa, agitado e 1 mL do conteúdo transferido para um tubo de ensaio contendo leite em pó reconstituído estéril para reduzir a população microbiana. Foram realizadas diluições seriadas do inóculo em tubos de leite até o nível de 10^2 células/mL, tomando como referência a curva de crescimento realizada para cada microorganismo.

3.2.4. Preparo das diluições

Os tubos com 10^7 (alta concentração), 10^4 (média concentração) e 10^2 (baixa concentração) células/mL, tiveram 1 mL retirado e transferido para um tubo com 9 mL de água peptonada estéril para realização de diluições seriadas e plaqueamento em duplicata nos três meios de cultura, como mostra a figura 4. As diluições utilizadas foram diferenciadas entre os meios devido ao número máximo de contagem de colônias em cada placa, sendo 150 nas placas de Petrifilm™ e 200 naquelas de BP e RPF. De cada tratamento foram realizadas 6 repetições.

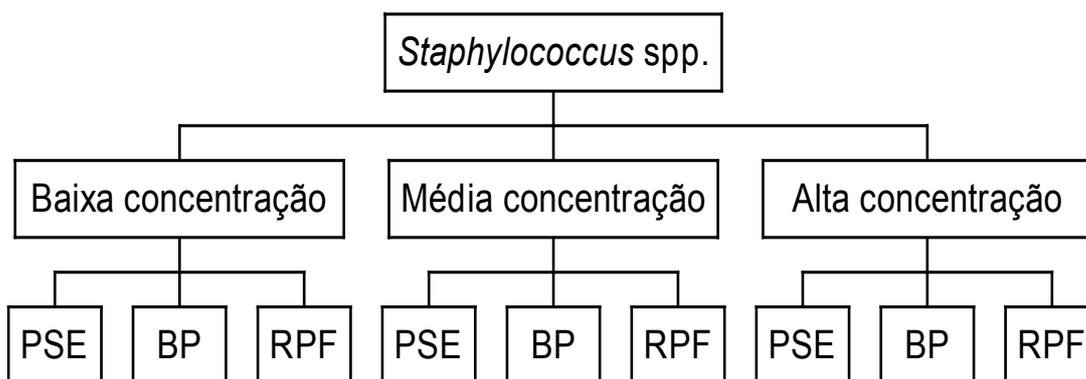


Figura 4. Esquema de inoculação e plaqueamento de culturas puras de *Staphylococcus* spp.

3.3. Métodos de análise

Após agitação das amostras por 25 vezes, foi transferido 1 mL de leite cru para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada, obtendo-se a diluição 10^{-1} . Foram preparadas diluições seriadas até 10^{-3} para todas as amostras e, então, procedeu-se o plaqueamento com auxílio da alça de Drigalsky nos meios Baird-Parker, Baird-Parker – RPF e Petrifilm™ Staph Express.

3.3.1. Plaqueamento em ágar Baird-Parker (BP)

O ágar Baird-Parker (Difco, Sparks, EUA) foi preparado conforme as instruções do fabricante e disposto em placas de Petri, em volume de 10 – 15 mililitros. As placas foram deixadas em repouso até a completa solidificação do meio, quando foram embaladas e estocadas em geladeira a 4°C. Antes da realização do plaqueamento, as placas eram devidamente identificadas com o número da amostra, diluição e data da realização da análise.

Sobre a superfície do ágar Baird-Parker, foi inoculado 0,1 mL de cada diluição preparada e espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalsky até completa absorção. As placas foram mantidas em posição normal por alguns minutos para assegurar absorção do inóculo, sendo então incubadas invertidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por 48 horas.

Após o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa, seguindo-se a contagem de colônias típicas e atípicas e registro do resultado final. Colônias típicas e atípicas das amostras de leite cru foram selecionadas para realização da prova de coagulase em tubos.

3.3.2. Enriquecimento em caldo BHI

As colônias selecionadas nas placas de ágar BP foram transferidas para caldo BHI

(Difco, Sparks, EUA). Os tubos foram incubados em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas para posterior realização da prova de coagulase. Este mesmo procedimento foi efetuado com as colônias selecionadas nas placas de Petrifilm™ Staph Express e ágar Baird-Parker – RPF para confirmação da coagulase após registro do resultado da contagem.

3.3.3. Prova de coagulase

A partir do crescimento em caldo BHI, foram transferidos 0,3 mL para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho (Laborclin, Pinhais, PR), que foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 6 horas. A presença de coágulos foi verificada, considerando os critérios presentes na Instrução Normativa 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003). Quando a reação de coagulação formou coágulos firmes e organizados, a prova foi considerada *Staphylococcus* coagulase-positivo, enquanto a ausência de coágulos caracterizou o resultado negativo para presença do microorganismo.

3.3.4. Plaqueamento em Petrifilm™ Staph Express (PSE)

As placas de Petrifilm™ Staph Express (3M Microbiology Products, St. Paul, EUA) foram retiradas da embalagem original e devidamente identificadas com o número da amostra, diluição e data da realização da análise.

Para distribuição do inóculo nas placas, o filme superior foi levantado e adicionado 1 mL da diluição correspondente no centro da placa, seguindo o abaixamento do filme sobre a amostra, evitando-se a formação de bolhas de ar. Imediatamente após esta operação, o difusor plano Petrifilm™ foi colocado sobre o centro da placa e pressionado levemente para espalhamento

uniforme do inóculo. Depois da retirada do difusor, as placas foram deixadas em repouso por alguns minutos para formação do gel e incubadas na posição horizontal, em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 horas.

Após o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa, seguindo-se a contagem de colônias. Quando apenas colônias vermelho-violetas eram visualizadas, as mesmas eram classificadas como *S. aureus*. Se houvesse presença de colônias de outras cores, fazia-se necessário o uso do disco Petrifilm™ Staph Express. Na análise de culturas puras, o disco de DNase foi utilizado em, pelo menos, uma placa de cada diluição analisada.

Para colocação do disco de DNase sobre a superfície do ágar, o filme superior da placa foi levantado e o disco colocado na área inoculada da placa, de forma que a aba permanecesse fora deste local. O filme foi abaixado e pressionado contra o disco para assegurar o contato deste com o gel. As placas foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 3 horas. Ao término do período de incubação, foi observada a ocorrência de reações de DNase, indicadas por áreas rosadas contendo ou não colônias. Estas áreas foram contadas e o resultado registrado foi associado ao *S. aureus*, mas pode indicar *S. hyicus* ou *S. intermedius*, segundo o fabricante. Após este procedimento, colônias das amostras de leite cru associadas ao halo róseo, foram selecionadas e incubadas em caldo BHI para posterior realização do teste de coagulase em tubos.

3.3.5. Plaqueamento em ágar Baird-Parker – RPF (RPF)

O ágar Baird-Parker – RPF (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e disposto em placas de Petri, em volume de 10 – 15 mililitros. As placas foram deixadas em repouso até a solidificação do meio, quando foram embaladas e estocadas em

geladeira a 4°C . Antes da realização do plaqueamento, as placas eram devidamente identificadas com o número da amostra, diluição e data da realização da análise.

Sobre a superfície do ágar Baird-Parker – RPF contido nas placas de Petri, foi espalhado 0,1 mL de cada diluição preparada e espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalsky esterilizada até completa absorção. As placas foram mantidas em posição normal por alguns minutos para assegurar absorção do inóculo, sendo então incubadas invertidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por 48 horas.

Após o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa, seguindo-se a contagem de colônias típicas e atípicas em contador de colônias, observando-se a presença ou ausência de halos brancos ao redor das colônias, característica que confere às amostras o resultado positivo ou negativo à prova de coagulase, procedendo-se então o registro do resultado final. Após este procedimento, colônias das amostras de leite cru que apresentaram halos brancos foram selecionadas e incubadas em caldo BHI para posterior realização do teste de coagulase em tubos.

3.4. Análise estatística

O delineamento utilizado na análise estatística de amostras de leite cru foi o de blocos ao acaso, no qual as amostras representavam os blocos e os tratamentos eram compostos pelos meios. A comparação das médias foi realizada pelo teste t, com nível de significância (p) de 0,05 (Sampaio, 2002).

Para a realização do experimento com inoculação de culturas puras em leite em pó reconstituído, foi usado o delineamento em blocos casualizados, com arranjo em parcelas sub-subdivididas, onde cada amostra (repetição) representou um bloco e os tratamentos foram dispostos em arranjo

fatorial 3x3x3, sendo as parcelas constituídas pelas três espécies bacterianas; as concentrações foram as sub-parcelas e os métodos foram considerados as sub-subparcelas, com seis repetições. A comparação das médias foi realizada utilizando-se o teste de Tukey, com nível de significância (p) de 0,05. Os resultados originais de UFC foram transformados para logaritmo na base 10 (L_{10}), de acordo com Sampaio (2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Comparação entre os meios de cultura Baird-Parker, Baird-Parker – RPF e Petrifilm™ Staph Express na detecção de *Staphylococcus* spp. em amostras de leite cru

Os resultados obtidos pela análise de 31 amostras de leite cru nos três meios de cultura estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Contagem de *Staphylococcus* spp. nos meios Petrifilm™ Staph Express (PSE), Baird-Parker (BP) e Baird-Parker – RPF (RPF)

| Meios | Contagem de UFC/mL (média ± s) | Log ₁₀ UFC/mL(média ± s) |
|-------|--|-------------------------------------|
| PSE | 6,55 x 10 ² ± 6,3 x 10 ² | 2,50 ^a ± 0,80 |
| RPF | 5,27 x 10 ⁴ ± 1,7 x 10 ⁵ | 3,86 ^b ± 1,01 |
| BP | 9,14 x 10 ⁴ ± 2,6 x 10 ⁵ | 4,12 ^b ± 1,05 |

Médias seguidas de letras iguais em uma mesma coluna indicam igualdade pelo teste t (p < 0,05).

Os resultados obtidos nas análises com o ágar BP, método de referência para enumeração de *Staphylococcus* spp., demonstram uma contagem elevada destes microorganismos nas amostras de leite analisadas, variando de $1,0 \times 10^0$ a $1,3 \times 10^6$ UFC/mL. Com estes dados, pode-se inferir que a incidência de *Staphylococcus* spp. nos rebanhos originários das amostras é alta, o que decorre tanto da presença de infecções mamárias nos animais, quanto da ausência de práticas higiênico-sanitárias pelos produtores. Dessa forma, as contagens refletem os diversos sistemas de produção e manejo existentes, nos quais são adotados diferentes programas de controle de mastite e de higienização de ordenhadores, que podem ser portadores do microorganismo, além de deficiências na limpeza dos equipamentos de ordenha.

Uma alta prevalência de *Staphylococcus* spp. também foi encontrada por Lamaita (2003) ao avaliar 80 amostras de leite cru coletadas em diferentes propriedades localizadas na Grande Belo Horizonte (MG), nas quais encontrou crescimento desta bactéria em 100% das amostras, com contagens variando de $1,0 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^7$

UFC/mL. Brant e Figueiredo (1994) avaliaram a prevalência de mastite em quatro rebanhos pertencentes à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), encontrando a ocorrência de 57,17% de *Staphylococcus* sp. dentre os microorganismos pesquisados.

A presença deste patógeno em tamanha magnitude incorre em comprometimento da qualidade do leite e da segurança alimentar, pois a contaminação elevada do leite cru pode levar à contaminação dos produtos derivados e produção de toxinas. Carmo *et al.* (2002) ao analisar amostras de leite cru e queijos produzidos com leite cru envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar em diferentes cidades de Minas Gerais, encontraram a presença de estafilococos coagulase-negativo em contagens acima de $2,0 \times 10^8$ UFC/g com produção de SEC e SED no leite cru. Nas amostras de queijos, as contagens de estafilococos coagulase-positivo variaram de $1,5 \times 10^5$ a $2,0 \times 10^8$ UFC/g, sendo detectada a produção de SEA, SEB e SEC.

Conforme os dados da tabela 2, foi encontrada diferença estatisticamente

significante entre o Petrifilm™ Staph Express (PSE) e os outros meios. No PSE, a contagem de UFC variou de $<1,0 \times 10^0$ a $3,0 \times 10^5$ UFC/mL, a qual foi notavelmente inferior às demais, que se encontraram entre $<1,0 \times 10^0$ e $1,3 \times 10^6$ UFC/mL no ágar BP, e de $<1,0 \times 10^0$ a $9,0 \times 10^5$ UFC/mL no ágar RPF. Este fato talvez possa ser atribuído à presença de uma elevada carga microbiana concomitante nas amostras que, embora não se desenvolva no meio em decorrência da ação de substâncias inibidoras, influenciaria o crescimento de *Staphylococcus* spp.. Esta possível ação dos demais microorganismos presentes na amostra pode ser explicada pela baixa seletividade do meio Baird-Parker em amostras com alto grau de contaminação, característica já percebida por diversos autores (Isigdi *et al.*, 1989; Ollis *et al.*, 1995; De Buyser *et al.*, 1998). Como o PSE é um meio de cultura à base de ágar Baird-Parker modificado, é possível que as deficiências do meio base tenham permanecido mesmo após as modificações realizadas na formulação original e que dificuldades de leitura ocorram quando as amostras estejam contaminadas com altos níveis da microbiota concomitante (AFNOR, 2007; 2008). De acordo com Ingham *et al.* (2003), é perceptível que os ágar BP e o PSE não possuem seletividade ótima para *S. aureus* na análise de alimentos crus de origem animal.

Ao comparar a contagem de *S. aureus* de 12 amostras de leite cru nos meios PSE e BP, Ingham *et al.* (2003) encontraram resultados equivalentes entre os meios, sendo o microorganismo detectado nas 12 amostras pelo PSE, enquanto o BP revelou a presença do mesmo em apenas 9, levando os pesquisadores à conclusão de haver similaridade entre os métodos. Neste estudo as contagens variaram de 1,0 a 3,0 log UFC/mL e as placas de PSE de todas as amostras apresentaram crescimento da microbiota concomitante, representado por colônias de outras cores que não vermelho-violeta. Neste mesmo estudo, os autores

aferiram o desempenho dos métodos na enumeração de *S. aureus* em queijo *mozzarella* artificialmente contaminado. Contudo, os resultados encontrados no PSE foram inferiores aos do BP nas análises realizadas aos 28 e 42 dias após a inoculação, independentemente da presença de colônias da microbiota acompanhante; porém esta diferença não foi elucidada pelos pesquisadores. Portanto, estas particularidades indicam que o meio não é completamente seletivo e corroboram os resultados encontrados no presente experimento.

Resultado análogo ao deste trabalho foi obtido por Ingham *et al.* (2004), que confrontaram os meios BP e PSE durante a avaliação do crescimento de *S. aureus* em presunto cozido por processo lento, inoculado com uma mistura de três cepas deste microorganismo. As contagens obtidas demonstraram que a recuperação de *S. aureus* no ágar BP foi ligeiramente maior ($p < 0,05$) que a obtida pelo PSE. Segundo os autores, uma possível explicação para este resultado seria a incapacidade de células injuriadas crescerem nas placas de PSE, o que incorreria na menor recuperação do microorganismo por este meio de cultura.

A similaridade entre os meios foi encontrada também por Tassinari *et al.* (2005), durante análise de 82 amostras de diferentes alimentos, incluindo queijo, bolos, salsichas, sanduíches e salgadinhos. Dentre estas, 77 apresentaram crescimento de *Staphylococcus* nos dois métodos, das quais 62 demonstraram resultados equivalentes e o nível de concordância entre ambos foi de 80,5%, o que para os autores foi considerado um excelente nível para um novo método. Entre os resultados discordantes, 9 (11,7%) amostras apresentaram contagens mais elevadas de *S. aureus* coagulase-positivo no PSE, enquanto 6 (7,8%) o fizeram utilizando o BP.

As placas do meio Petrifilm™ Staph Express são comercializadas acompanhadas

por um disco para a realização do teste de DNase. Este contém azul de toluidina para facilitar a reação de desoxiribonuclease (DNase), enzima que rompe as fitas do ácido nucléico e apresenta uma correlação com a coagulase por ser produzida pelos *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo (Jay, 2005). Dessa forma, a DNase já foi usada como ferramenta diagnóstica para a identificação de cepas de *S. aureus* e previsão de sua patogenicidade. Porém, as provas da atividade desta enzima não refletem resultados fidedignos como a prova de coagulase (Koneman *et al.*, 1993). Este disco deve ser usado, segundo o fabricante, quando colônias de outras cores estiverem presentes na placa, pois as colônias de *S. aureus* podem assumir a coloração preta, enquanto a coloração verde-azulada pertence a colônias de outras bactérias (Petrifilm™..., 2004).

Das 46 colônias DNase positivo isoladas para confirmação da produção de coagulase, apenas 43,47% (20/46), como mostra o gráfico 1, resultaram em coágulos de níveis 3 e 4, os quais são considerados como resultado positivo pela metodologia oficial (Brasil, 2003). Silbernagel *et al.* (2003) encontraram um resultado superior ao aqui relatado pois, das 468 colônias vermelho-violeta ou associadas ao halo cor de rosa, 442 foram classificadas como coagulase-positivo. Por estes dados podemos perceber que, embora haja correlação entre as enzimas DNase e coagulase, o mais indicado é a realização do teste de coagulase em tubos pois esse é um dos testes que classifica o microorganismo conforme os parâmetros preconizados pela RDC 12 (Brasil, 2001) para pesquisa microbiológica em alimentos.

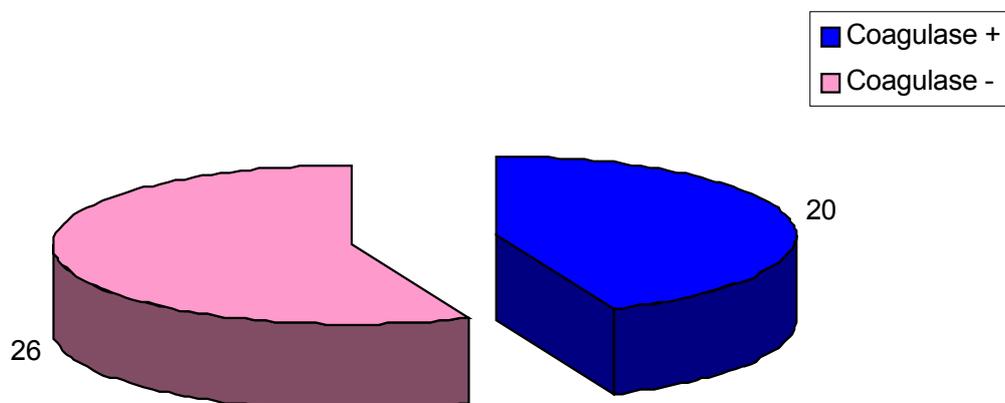


Gráfico 1. Resultado do teste de coagulase de 46 colônias de *Staphylococcus* spp. DNase positivo, selecionadas das placas de Petrifilm™ Staph Express.

Uma desvantagem observada no teste de DNase do PSE, é a variabilidade da interpretação por diferentes analistas. Isso se deve à tonalidade da coloração rósea que se desenvolve ao redor das colônias à medida que a reação ocorre, a qual varia desde o rosa pálido até um rosa intenso. Esta variabilidade foi tomada como objetivo de um dos experimentos realizados por Silva *et al.* (2005) em uma avaliação do uso do Petrifilm™ como ferramenta diagnóstica para mastite. Uma grande variação individual foi encontrada entre as leituras realizadas pelos voluntários, o que demonstra a necessidade de padronização dos critérios de interpretação para que os resultados alcançados sejam reprodutíveis.

Como vantagens do PSE, podem ser citadas a simplicidade da metodologia de análise, na qual poucos materiais são mobilizados; a rapidez na leitura de resultados e, principalmente, a ausência de desperdícios de meio, pois somente o número necessário de placas é retirado das embalagens, sendo o restante congelado para posterior utilização, mantendo o prazo de validade original enquanto se encontrar nesta condição. O PSE também apresenta a conveniência de apresentar-se pronto para o uso, sendo necessário apenas esperar que atinja a temperatura ambiente ao retirá-lo da embalagem, sem precisar de qualquer preparo prévio à análise, o que favorece a utilização deste meio por laboratórios com infra-estrutura básica. Além destas, para armazenamento e congelamento das placas o espaço requerido é menor que o utilizado para placas de Petri usadas nas demais metodologias.

Uma inconveniência observada na placa de PSE é o fato desta possuir uma área menor do que a de uma placa de Petri, o que implica em um menor limite de contagem de contagem de colônias, sendo este de 15 a 150, segundo as recomendações do fabricante (Petrifilm™..., 2004), enquanto o limite preconizado pela IN 62 (Brasil, 2003)

é estabelecido entre 20 e 200 colônias na metodologia convencional. Dessa maneira, é necessária a realização de diluições seriadas mais elevadas para análise de amostras com maior nível de contaminação, levando ao aumento do tempo e do número de tubos de diluente gastos para a execução da análise.

Dentre as instruções de uso do PSE está a indicação de que, se apenas colônias vermelho-violeta estiverem presentes na placa, estas devem ser contadas como *S. aureus*, estando o teste concluído por não haver necessidade do uso do disco Petrifilm™ Staph Express. Como a legislação vigente (Brasil, 2001) prevê a pesquisa de *Staphylococcus* coagulase-positivo, a utilização do disco de DNase presume a presença destas cepas na amostra. Portanto, se o disco não é aplicado à placa sob análise, não se pode classificar o microorganismo tendo como base apenas a coloração das colônias, uma vez que outros estafilococos coagulase-positivo também podem se apresentar sob essa cor, além de não ser obtida sua qualificação quanto à produção das enzimas pesquisadas. Assim sendo, a confirmação da identidade dos microorganismos é necessária para obtenção de resultados mais precisos para a análise. Esta opinião é compartilhada por Silva *et al.* (2005), que confirmaram a presença de *S. aureus* em apenas 8 das 35 placas de PSE que continham somente colônias típicas deste microorganismo.

Outro questionamento sobrevivendo acerca do PSE está relacionado à indicação presente nas instruções de uso do PSE a respeito da contagem de colônias que crescem na barreira de espuma da placa que, de acordo com as recomendações do fabricante, não devem ser contadas por não estarem sob ação dos agentes seletivos presentes no meio. No entanto, não é especificado se estas colônias são apenas aquelas que crescem completamente por sobre a barreira, ou se as colônias que possuem uma borda junto à espuma também não devem ser

contadas. Esta pequena diferenciação no procedimento de contagem pode causar uma subestimação na enumeração, prejudicando o julgamento final da análise.

No ágar Baird-Parker com RPF (RPF), a contagem de *Staphylococcus* spp. encontrou-se entre $<1,0 \times 10^0$ e $9,0 \times 10^5$ UFC/mL, resultados semelhantes aos obtidos com o BP, que obteve contagens entre $<1,0 \times 10^0$ e $1,3 \times 10^6$ UFC/mL, indicando haver equivalência entre as contagens deste microorganismo quando dois meios são comparados entre si. Esta inferência é compartilhada por diversos pesquisadores (Ollis *et al.*, 1995; Reynaud *et al.*, 1997; De Buyser *et al.*, 1998; Zangerl, 1999) que realizaram estudos contrapondo estes meios de cultura. No entanto, as contagens de UFC foram mais elevadas no BP em quase todas as amostras, o que pode ser imputado ao desenvolvimento de bactérias não-*Staphylococcus* decorrente da seletividade insuficiente deste meio.

Segundo Zangerl (1999), a baixa seletividade do BP frente às amostras com alta carga microbiana pode ser explicada pela influência das peptonas presentes no meio sobre a inibição promovida pelo cloreto de lítio. Com isso, torna-se necessário testar os meios de cultura disponíveis no mercado antes de sua utilização devido à variabilidade encontrada pelo autor na análise do meio base de dois fabricantes comparados sem adição dos suplementos, ou seja, a gema de ovo no ágar BP e o plasma de coelho no ágar RPF.

A igualdade entre os meios BP e RPF foi primeiramente observada por Beckers *et al.* (1984), que desenvolveram o método. Ao comparar o RPF ao BP e ao ágar com plasma suíno (PPF) na análise de diversos alimentos, dentre eles leite cru e queijos produzidos com leite cru, os mesmos não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os resultados. A partir dos resultados de todas as análises, os autores

consideraram a eficiência do RPF semelhante à do BP e o apontaram como um meio adequado para a enumeração de *S. aureus* em alimentos.

Em 1995, Ollis *et al.* avaliaram o BP e o RPF na detecção de *S. aureus* em amostras de leite de tanque, oriundas de 58 rebanhos positivos e 19 negativos para esta bactéria. Os resultados dos dois meios foram similares em 74 das 77 culturas, sendo que a positividade de 52 e 55 rebanhos foi confirmada pelo RPF e BP, respectivamente. Para o RPF a sensibilidade foi de 89,7% e a especificidade de 100%; para o BP, estes valores foram de 94,8% para o primeiro parâmetro e 100% para o segundo. Apesar da equivalência encontrada, os autores preferiram o uso do RPF por este apresentar uma melhor eficiência na diferenciação entre as colônias devido ao halo de coagulase, o que reduz o tempo para verificação da colônia.

Reynaud *et al.* (1997) também notaram um maior desenvolvimento da microbiota acompanhante no BP ao confrontá-lo ao RPF na enumeração de *Staphylococcus* coagulase-positivo (SCP) em queijos produzidos com leite cru e/ou tratado termicamente. De 217 amostras submetidas às análises, 177 apresentaram contagens de SCP comparáveis nos dois meios. Contudo, em 19 amostras a presença de microbiota acompanhante impossibilitou a enumeração no BP, mas não exerceu influência no resultado do RPF. Assim, este meio também foi considerado pelos pesquisadores mais indicado para a realização de análises de produtos que não passaram por tratamento térmico, enquanto o BP deve ser preferido para aqueles que passarem por este tratamento.

Igualmente aos demais, De Buyser *et al.* (1998) encontraram similaridade entre estes meios de cultura ao cotejá-los na enumeração de estafilococos coagulase-positivo presentes em quatro tipos de queijo

de leite cru naturalmente contaminados. Das 77 amostras analisadas, 20 não foram consideradas na análise estatística por apresentarem diversos problemas de leitura nos dois métodos. Nas 57 amostras restantes, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os meios para nenhum tipo de queijo, indicando a homogeneidade dos métodos de detecção de *Staphylococcus* coagulase-positivo. Todavia, como nos demais trabalhos o RPF foi considerado mais apropriado para a realização de análises em produtos originados de leite cru pois, das 77 amostras, apenas 5 não tiveram resultados aproveitados neste meio, o que ocorreu em 18 amostras submetidas à análise pelo BP, sinalizando que o RPF alcança resultados similares ou mais precisos que o BP, com leitura mais simples e rápida (De Buyser *et al.*, 1998).

Resultados semelhantes também foram encontrados por Zangerl (1999), que comparou o desempenho do BP e RPF, ambos de diferentes fabricantes, na detecção de *S. aureus* em 56 amostras leite cru e de queijos preparados com o mesmo. O microorganismo foi detectado em 34 amostras pelo ágar BP, enquanto no ágar RPF, a recuperação ocorreu em 42 amostras. Dentre as conclusões obtidas, o uso de BP é ponderado pelo autor na análise de amostras que apresentem carga microbiana elevada e recomenda o uso do RPF nas análises de leite cru e derivados, visto que o primeiro apresentou contagens superiores às do segundo meio, principalmente nas análises das amostras de queijo. Além desta, há a

recomendação quanto à variação da eficiência do meio base de acordo com o fabricante, que se deve à diferença observada no crescimento de colônias da microbiota concomitante no BP das diferentes marcas testadas.

Embora o ágar BP seja um meio criado para a enumeração de células viáveis e injuriadas de *S. aureus*, o mesmo apresenta algumas desvantagens, relacionadas principalmente à caracterização das colônias neste meio e à contaminação concomitante presente nos alimentos sob investigação. Segundo Beckers *et al.* (1984), a repetibilidade de contagens no BP é baixa devido às variações na leitura da reação de hidrólise da lipovitelina que ocorrem, especialmente, em alimentos contaminados com *S. aureus* que não originam esta reação, ou por espécies de estafilococos coagulase-negativo que promovem a hidrólise. No presente experimento, apenas 11,5% (429/3.730) das colônias presentes nas placas de BP apresentavam-se como colônias típicas. Foram isoladas 155 colônias das placas de BP, sendo 62 típicas e 93 atípicas, para confirmação da coagulase. Apenas 20,65% (32/155) apresentaram formação de coágulos tipos 3 e 4, das quais 18 apresentavam-se como colônias típicas e 14 como atípicas, o que é demonstrado pelo gráfico 2. Este resultado demonstra que a aleatoriedade na escolha de colônias a serem confirmadas, assim como a variabilidade entre as características próprias de cada tipo de colônia, podem levar a resultados inexatos, ao contrário do resultado da reação de coagulase fornecida pelo RPF.

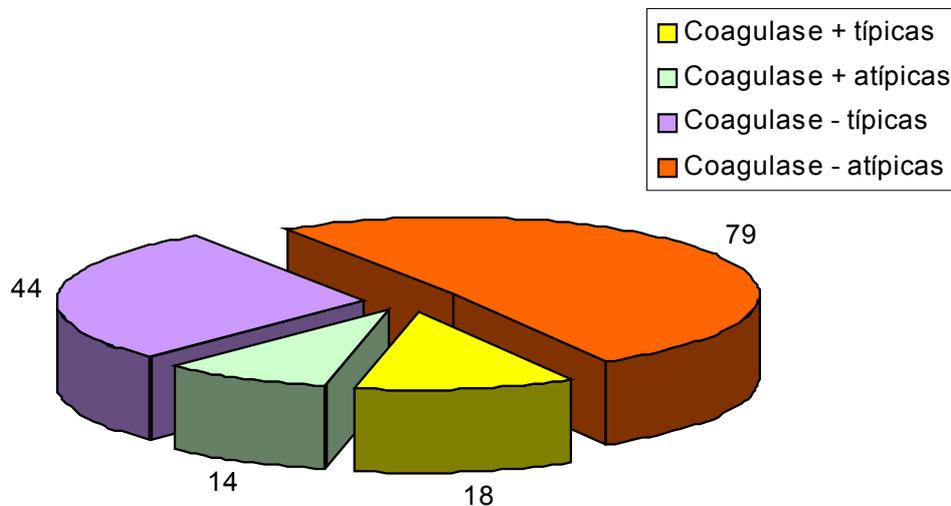


Gráfico 2. Resultado do teste de coagulase de 155 colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus* spp. crescidas em ágar Baird-Parker.

Outra condição favorável à diversidade das leituras citada na literatura é a presença de cocos Gram-positivo em maior quantidade que *S. aureus* no alimento. Portanto, é necessário um bom treinamento do analista para percepção deste halo e diferenciação das colônias de *S. aureus* daquelas dos demais *Staphylococcus* spp. no ágar BP, obtendo bons índices de detecção deste microorganismo (Ollis *et al.*, 1995). Entretanto, ainda se faz necessária a confirmação das colônias suspeitas de *S. aureus*, o que aumenta o tempo de liberação de resultados das análises.

O meio RPF apresenta como vantagem a leitura precisa do teste de coagulase concomitante à contagem de unidades formadoras de colônias, reduzindo o tempo necessário para realização da análise. Das 48 colônias submetidas ao teste de coagulase em tubos, 72,91% (35/48), como indica o gráfico 3, apresentaram formação de coágulos nível 3 e 4, o que indica haver uma boa concordância entre os resultados e confirma a possibilidade de realização de análises mais rápidas com este meio. Além disso, este meio tem revelado ser mais específico que o BP, o que foi observado por

diversos trabalhos (Reynaud *et al.*, 1997; De Buyser *et al.*, 1998; Zangerl, 1999), bem como nesse experimento, tornando-o mais recomendável para análise de produtos com cargas microbianas mais elevadas, como leite cru e queijos.

Como desvantagens do meio RPF, podemos citar a reversão dos halos de fibrina sucedida em amostras com carga microbiana elevada, decorrente da ação de enzimas produzidas pelos microorganismos acompanhantes (De Buyser *et al.*, 1998; Zangerl, 1999; Baird-Parker – RPF, 2000) e coalescência dos halos quando as colônias se encontram muito próximas, o que dificulta a enumeração (De Buyser *et al.*, 1998). Também são citadas como desvantagens pela literatura, a necessidade de diluição da amostra para que o meio não fique opaco e induza a erros de interpretação da reação de coagulase (Reynaud *et al.*, 1997; Zangerl, 1999), e o elevado custo do meio em decorrência da disponibilidade e qualidade do plasma de coelho e fibrinogênio bovino no mercado (Reynaud *et al.*, 1997; De Buyser *et al.*, 1998; Zangerl, 1999).

Neste experimento, uma das desvantagens observadas foi a necessidade de aquecimento de um maior número de frascos para a fusão do meio base destinado à preparação das placas. Isso se deve ao fato de cada frasco conter 90 mL do ágar BP que, somados aos 10 mL de RPF, resultam em 100 mL de meio. Considerando que são necessários 10 a 15 mL por placa, para a preparação de doze placas para análise de quatro amostras, é preciso fundir o conteúdo de dois frascos e preparar um número maior de placas, o que incorre em estocagem destas e numa possível perda de meio caso as mesmas não sejam utilizadas em duas semanas, prazo recomendado pelo fabricante (Baird-Parker – RPF, 2000). Outras inconveniências dignas de nota observadas neste trabalho foram a coalescência de halos em algumas placas e, principalmente, o custo do meio.

4.2. Comparação entre os meios de cultura Baird-Parker, Baird-Parker – RPF e Petrifilm™ Staph Express na detecção de *Staphylococcus aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* inoculados em leite reconstituído esterilizado

As curvas de crescimento dos *Staphylococcus* utilizados neste experimento são apresentadas nos gráficos 4, 5 e 6. A partir das médias das contagens resultantes das curvas de crescimento, foi estipulado o período de incubação em caldo BHI para que a população de 10^9 células/mL, aproximadamente, fosse alcançada. Para o *S. intermedius* este período foi de 7 horas e de 8 horas para o *S. hyicus*, enquanto para o *S. aureus* o mesmo foi de 10 horas.

Os resultados das contagens de *Staphylococcus* spp. nas amostras de leite inoculado nos três meios de cultura estão representados na tabela 3.

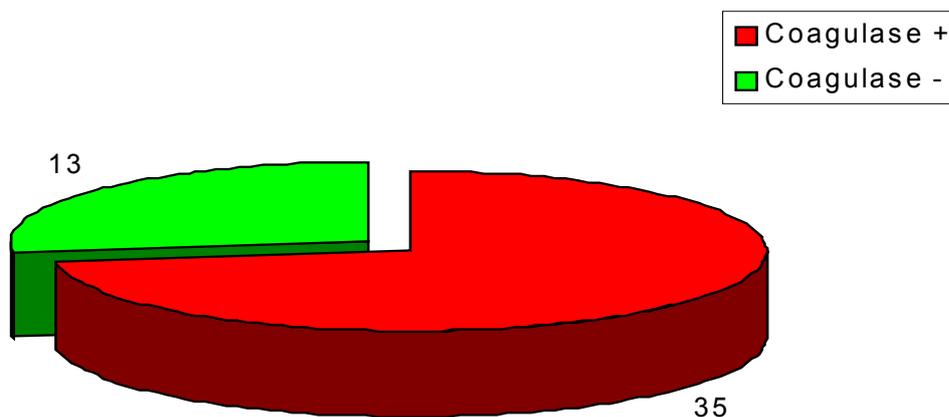


Gráfico 3. Resultado do teste de coagulase de 48 colônias típicas de *Staphylococcus* spp. em ágar Baird-Parker – RPF.

Tabela 3. Contagens de *Staphylococcus* spp. nos meios Petrifilm™ Staph Express (PSE), Baird-Parker (BP) e Baird-Parker – RPF (RPF)

| Bactéria | Log ₁₀ UFC/mL (média ± s) | | |
|-----------------------|--------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | PSE | BP | RPF |
| <i>S. intermedius</i> | 4,91 ^{aA} ± 1,85 | 5,16 ^{bA} ± 1,90 | 5,15 ^{bA} ± 1,85 |
| <i>S. hyicus</i> | 5,07 ^{aA} ± 1,91 | 5,21 ^{aAB} ± 1,89 | 5,16 ^{aA} ± 1,88 |
| <i>S. aureus</i> | 5,06 ^{aA} ± 1,90 | 5,38 ^{bb} ± 1,98 | 5,30 ^{bA} ± 1,99 |
| Média | 5,01 ^a ± 1,85 | 5,25 ^b ± 1,89 | 5,20 ^b ± 1,87 |

Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas em uma mesma linha e maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

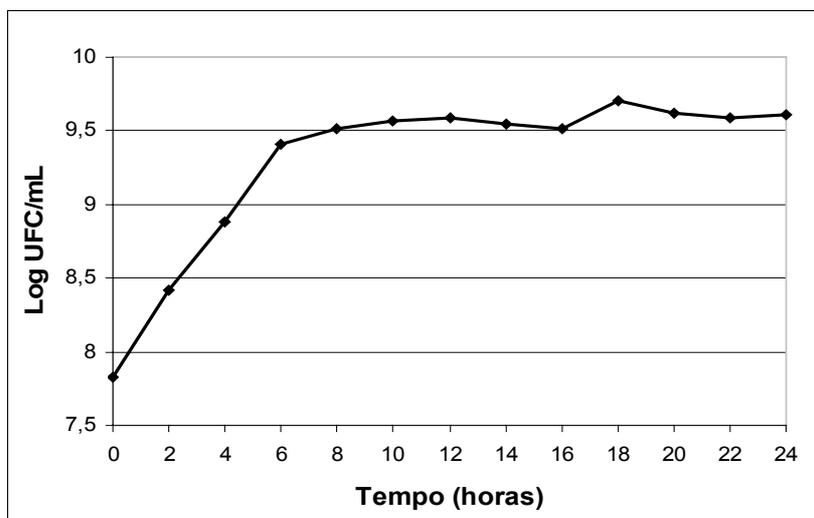


Gráfico 4. Curva de crescimento de *Staphylococcus intermedius* em caldo BHI.

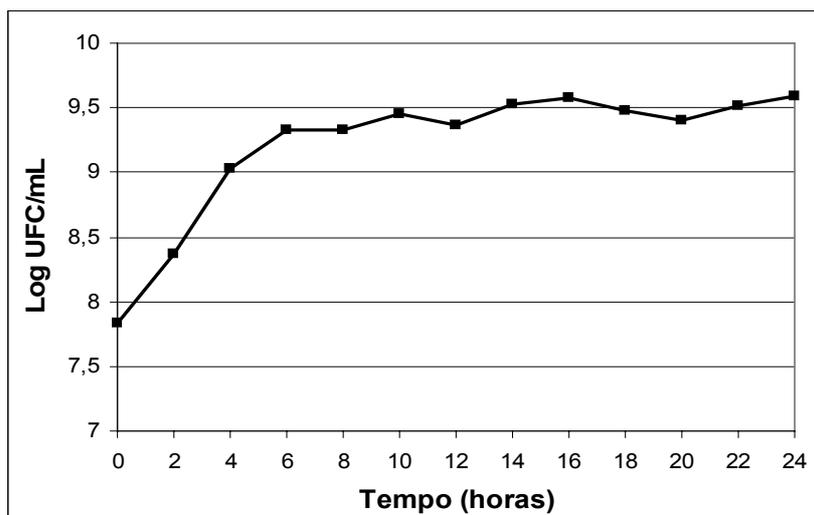


Gráfico 5. Curva de crescimento de *Staphylococcus hyicus* em caldo BHI.

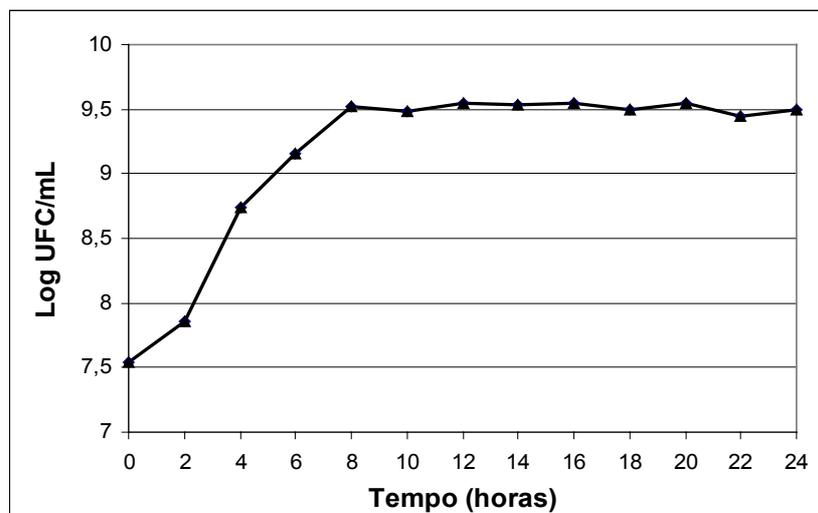


Gráfico 6. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* em caldo BHI.

A análise estatística dos dados demonstrou apenas a interação entre bactérias e meios, indicando que os demais fatores não apresentaram relevância. Dessa forma, pode-se perceber pelos resultados apresentados que os três meios foram eficazes na detecção das amostras de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo avaliadas e, como não houve interação entre meios e concentração do inóculo, é presumido que os mesmos apresentem sensibilidade adequada para a enumeração das cepas bacterianas, independentemente do nível de contaminação do alimento por este microorganismo.

Ao analisar as contagens das três espécies de *Staphylococcus* no meio PSE, é visto que não houve diferença entre as mesmas. No entanto, ao observar a média geral, nota-se que o PSE teve contagens menores que o BP e RPF, embora as contagens de *S. hyicus* tenham sido equivalentes nos três meios. Quando os resultados das contagens de *Staphylococcus* spp. nos meios BP e PSE são contrapostos, é vista a diferença existente entre eles, com resultado superior para o BP. Na comparação entre PSE e RPF o resultado também é desfavorável ao primeiro, uma vez que a enumeração de *S.*

aureus e *S. intermedius* foi superior no RPF.

Silbernagel *et al.* (2003) encontraram resultados discrepantes dos obtidos neste experimento ao compararem o PSE e BP para análise de leite cru, queijo tipo *mozzarella*, soro em pó, sorvete e iogurte inoculados com dois níveis de contaminação por culturas puras de *S. aureus*, e um terceiro inóculo contendo este microorganismo associado a uma cultura pura de *Enterococcus faecalis*. Na análise dos diversos alimentos, as médias de contagem em ambos os meios foram similares em todos os níveis, exceto na amostra de sorvete inoculada com cultura mista, onde as médias foram superiores para o BP. Com base nestes resultados, os autores consideram o PSE equivalente ao outro meio.

Resultados semelhantes aos deste trabalho também foram encontrados por Ingham *et al.* (2003) em uma apreciação do PSE para enumeração de *S. aureus* em amostras de queijo tipo *mozzarella* artificialmente contaminado com amostras do microorganismo e avaliadas aos 0, 14, 28 e 42 dias após a inoculação. As médias das contagens dos dias 0 e 14 foram

próximas para os dois meios, mas aos 28 e 42 dias o PSE apresentou médias significativamente diferentes daquelas alcançadas com o uso do BP. Segundo os autores, a causa desta diferença não foi esclarecida, mas poderia ser causada pela microbiota concomitante presente no queijo.

Quanto às características apresentadas pelas colônias das três espécies crescidas no PSE, observa-se que a coloração variou de vermelho-violeta a preto. Segundo as instruções de uso deste meio (Petrifilm™..., 2004), o teste estará concluído caso apenas colônias vermelho-violeta estejam presentes nas placas, classificando-as diretamente como *S. aureus*, sem realização de qualquer teste bioquímico para caracterizá-las. Contudo, neste experimento foi observado que as colônias de *S. intermedius* e *S. hyicus* também apresentavam esta coloração, o que indica a necessidade de realização de outros testes para liberação de resultados com maior grau de confiabilidade, consideração corroborada por Silva *et al.* (2005). Além disso, como a legislação vigente preconiza a pesquisa *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo, o uso do disco de DNase deveria ser efetuado em todas as análises, independentemente da coloração das colônias, uma vez que esta enzima possui uma correlação com a coagulase. No entanto, para o fabricante o uso do disco de DNase é indicado apenas quando colônias de coloração preta ou verde-azulada ocorrerem na placa.

Outro questionamento a ser feito é sobre a associação dos halos cor de rosa ao *S. aureus* presente nas recomendações do meio. Nas placas utilizadas nesta fase do experimento, um total de 1.899 colônias foi contabilizado, sendo que 1.700 (89,52%) apresentaram-se associadas ao halo róseo após a incubação com o disco de DNase. O *S. intermedius* apresentou o maior índice de colônias DNase positiva (91,84%), seguido pelo *S. aureus* (91,76%) e *S. hyicus* (86,29%), como mostra o gráfico 7. Por estes índices, pode-se perceber que algumas colônias das três espécies não produziram DNase, indicando que mesmo colônias de bactérias produtoras desta enzima podem não estar associadas ao halo róseo após incubação com o disco, o que inviabiliza a afirmativa feita pelo fabricante de que as colônias que não estiverem associadas ao halo não são *S. aureus* e, portanto, não devem ser contadas para liberação do resultado da análise. De acordo com os dados apresentados, conclui-se que é necessária a realização de outros testes para identificar o microorganismo presente na amostra, a qual não deve ser feita apenas pela caracterização da colônia no meio.

Comparando o RPF e o BP, foi notado que estes meios demonstraram resultados equivalentes, com médias de 5,20 e 5,25 \log_{10} UFC/mL, respectivamente, indicando que a substituição do uso de BP pelo RPF na análise de leite é pertinente, sem perdas de qualidade do meio e com a vantagem da leitura direta da prova de coagulase.

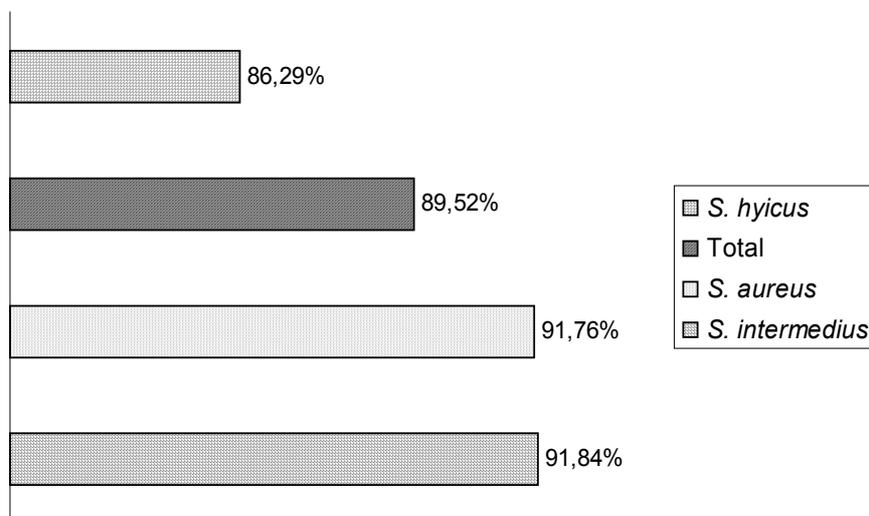


Gráfico 7. Percentual de colônias, total e por espécie de *Staphylococcus*, associadas ao halo róseo nas placas de Petrifilm™ Staph Express.

A equivalência entre BP e RPF também foi encontrada por Beckers *et al.* (1987), que compararam os resultados obtidos com estes meios na análise de diversas amostras de sorvete artificialmente contaminadas com duas cepas de *S. aureus*, uma amostra de *Micrococcus luteus* e um coco Gram-positivo não identificado. A análise das amostras contaminadas com as cepas de *S. aureus* demonstrou um resultado similar entre os dois meios, com o RPF apresentando um desvio-padrão menor que o BP, o qual teve contagens do microorganismo maiores que o outro meio, tal como no experimento aqui relatado.

De Buyser *et al.* (2003), também encontraram similaridade entre o BP e RPF em um estudo colaborativo realizado entre laboratórios europeus, no qual foram obtidos resultados análogos nas análises de amostras de queijo; carne e ovo em pó, artificialmente contaminados com inóculos de diferentes concentrações de *S. aureus* e *S. epidermidis* ou outro *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo. Por não apresentarem diferenças

significativas na precisão de enumeração dos microorganismos testados, os meios foram considerados equivalentes, culminando na validação do RPF como método oficial em território europeu.

No ágar BP, as colônias se apresentaram com coloração negra e brilhante, consistência cremosa e forma convexa, sendo algumas colônias circundadas por um halo claro devido à reação de hidrólise da lipovitelina. De um total de 3.523 colônias presentes nas placas das três espécies, apenas 45,7% (1.610) exibiam todas as características típicas. Conforme gráfico 8, o *S. hyicus* não apresentou colônia típica, indicando que estes microorganismos, quando presentes em um alimento submetido à averiguação, podem se mostrar com características diferentes daquelas tidas como próprias do gênero no BP e reforça a necessidade de confirmação da identidade das colônias atípicas presentes nas placas, o que já foi constatado por diversos pesquisadores (Stadhouders *et al.*, 1976; Hauschild *et al.*, 1979).

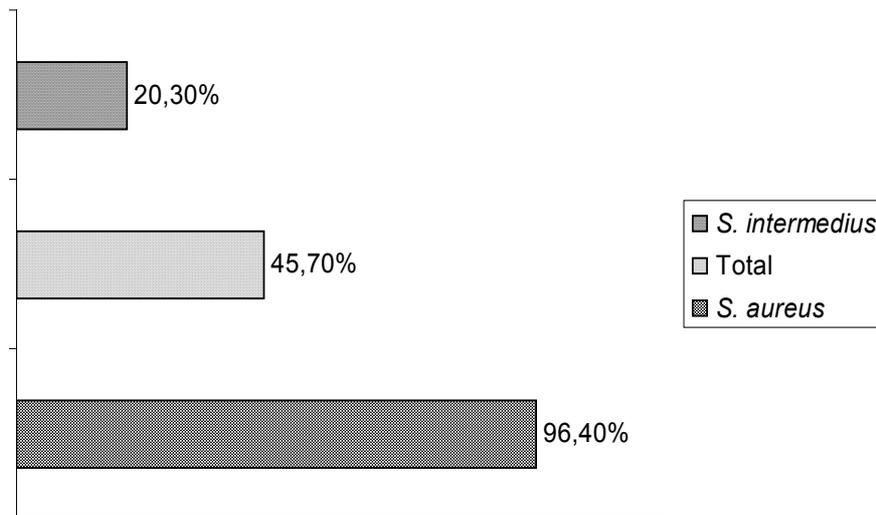


Gráfico 8. Percentual de colônias típicas total e por espécie de *Staphylococcus* apresentando características típicas no ágar Baird-Parker.

No RPF, as colônias também apresentaram as características acima citadas e uma área opaca de precipitação ao invés do halo claro, demonstrando a ocorrência de reação positiva de coagulação do plasma presente no meio. A porcentagem de colônias coagulase-positivo dos três estafilococos foi de 66,07% (1.774/2.685), sendo que a espécie que apresentou maior índice foi o *S. hyicus* (95,87%), como é ilustrado pelo gráfico 9. Este resultado mostra que estafilococos coagulase-positivo podem não

expressar a produção desta enzima característica, o que leva à subestimação dos resultados obtidos em análises de alimentos e, conseqüentemente, a uma exposição do consumidor às amostras toxigênicas. Portanto, o resultado negativo para prova da coagulase não significa que o *Staphylococcus* spp. isolado não seja produtor de toxinas, mas que qualquer amostra deste microorganismo isolada de alimentos deve ser considerada como potencialmente capaz de produzir toxinas.

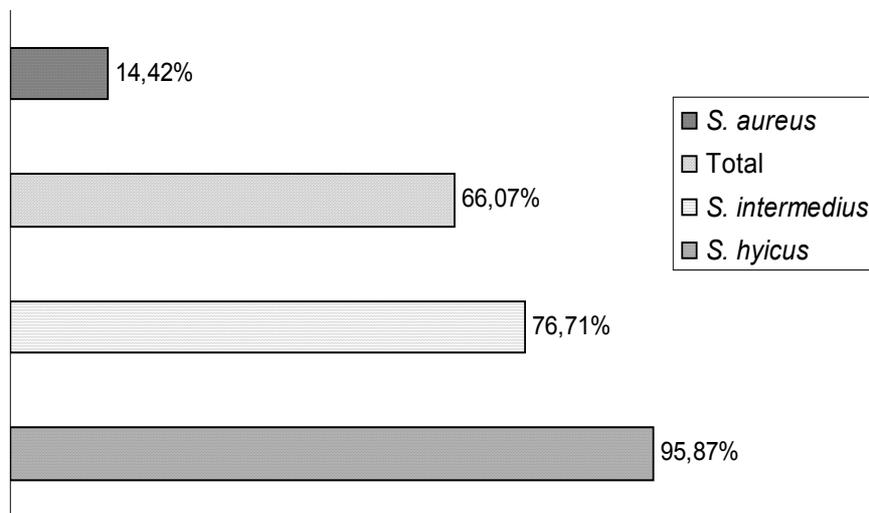


Gráfico 9. Percentual de colônias coagulase-positivo total e por espécie de *Staphylococcus* apresentando características típicas no ágar Baird-Parker – RPF.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com uso do Petrifilm™ Staph Express na enumeração de *Staphylococcus* spp. nas amostras de leite cru e das cepas de *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* inoculados em leite reconstituído esterilizado em diferentes concentrações, foram diferentes ($p < 0,05$) dos resultados encontrados no ágar Baird-Parker.

As colônias de *S. hyicus* e *S. intermedius* também se apresentaram sob coloração vermelho-violeta no meio Petrifilm™ Staph Express, semelhantemente às colônias de *S. aureus*, indicando a necessidade de realização de outros testes para real identificação dos microorganismos e emissão de resultados de maior confiabilidade, uma vez que as espécies avaliadas se comportaram de forma similar.

As médias de contagem de colônias de *Staphylococcus* spp. em amostras de leite cru, assim como das três espécies de *Staphylococcus* inoculados em leite reconstituído esterilizado em diferentes

concentrações, foram semelhantes no ágar Baird-Parker e no ágar Baird-Parker – RPF, demonstrando a equivalência existente entre estes meios e ausência de influências da espécie presente na amostra, além de apresentar leitura rápida e simples. Dessa forma, há possibilidades de substituição sem perdas de qualidade e com resultados obtidos com maior agilidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. Agentes bacterianos de enfermedad transmitida por alimentos. In: _____ *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1997, cap. 7, p. 195 – 276.
- ADESIYUN, A.A.; WEBB, L.A.; ROMAIN, H.T. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 5, p. 629 – 632, 1998.

ADESIYUN, A.A.; TATINI, S.R.; HOOVER, D.G. Production of enterotoxin(s) by *Staphylococcus hyicus*. *Veterinary Microbiology*, v. 9, n. 5, p. 487 – 495, 1984.

AFNOR validation according to the ISO 16140 of the 3M™ Petrifilm™ Staph Express System (STX system) for the “coagulase-positive *Staphylococcus*” enumeration in food products – Reference method EN ISO 6888-2. 2008. Disponível em: <<http://www.afnor-validation.com/afnor-validation-validated-methods/staphylococcus.html>>. Acessado em: 03/06/2008.

AFNOR validation according to the ISO 16140 of the 3M™ Petrifilm™ Staph Express System (STX system) for the “coagulase-positive *Staphylococcus*” enumeration in food products – Reference method EN ISO 6888-2. 2007. Disponível em: <<http://www.afnor-validation.com/afnor-validation-validated-methods/staphylococcus.html>>. Acessado em: 03/06/2008.

AIELLO, S.E.; MAYS, A. (Eds.) *Manual Merck de veterinária*. 8. ed. São Paulo: Roca, 2001, 1861 p.

ALMAZAN, J.; DE LA FUENTE, R.; GOMES-LUCIA, E. *et al.* Enterotoxin production by strains of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus aureus* isolated from dog infections. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene Abt. A*, v. 264, n. 1 – 2, p. 29 – 32, 1987.

ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T. *et al.* An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*, v. 130, n. 1, p. 33 – 40, 2003. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayJournal?jid=HYG>>. Acessado em: 10/09/2007.

ASSUMPCÃO, E.G.; PICCOLI-VALLE, R.H.; HIRSCH, D. *et al.* Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 3, p. 366 – 370, 2003.

BAIRD-PARKER – RPF: meio. [Marcy l'Etoile]: bioMérieux, [2000]. Bula de meio de cultura.

BAIRD-PARKER, A.C. The staphylococci: an introduction. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, v. 69, n. 19, p. 1S – 8S, 1990.

BAIRD-PARKER, A.C. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 25, n. 1, p. 12 – 19, 1962.

BAUTISTA, L.; GAYA, P.; MEDINA, M. *et al.* A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n. 2, p. 566 – 569, 1988. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/reprint/54/2/566.pdf>>. Acessado em: 11/01/2008.

BECKER, K.; KELLER, B.; VON EIFF, C. *et al.* Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 12, p. 5551 – 5557, 2001. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/reprint/67/12/5551.pdf>>. Acessado em 11/08/2006.

BECKERS, H.J.; TIPS, P.D.; PATEER, P.M. Collaborative study on the precision of the enumeration of *Staphylococcus aureus* in food. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Serie B*, v. 184, n. 1, p. 71 – 77, 1987.

BECKERS, H.J.; VAN LEUSDEN, F.M.; BINDSCHEDLER, O. *et al.* Evaluation of a pour-plate system with a rabbit plasma – bovine fibrinogen agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in food. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 30, n. 4, p. 470 – 474, 1984.

BECKERS, H.J.; VAN LEUSDEN, F.M.; HOGEBOM, W.M. *et al.* Comparative studies with some media for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in food. *De Ware(n)-Chemicus*, v. 10, n. 3, p. 125 – 130, 1980.

BENNETT, R.W. Detection and quantitation of Gram-positive non sporeforming pathogens and their toxins. In: PIERSON, M.D.; STERN, N.J. (Eds.). *Foodborne microorganisms and their toxins: developing methodology*. Nova York: Marcel Dekker Inc., 1986, p. 345.

BERGDOLL, M.S. Toxic shock syndrome. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v. 3, n. 1, p. 6 – 21, 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-79301997000100002&script=sci_arttext&lng=>. Acessado em: 29/01/2008.

BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning. In: CLIVER, D. O. (Ed.) *Foodborne diseases*. San Diego: Academic Press Inc., 1990, cap. 5, p. 85 – 106.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P. (Ed.) *Foodborne bacterial pathogens*. New York: Marcel Dekker Inc., 1989, cap. 11, p. 463 – 523.

BERGDOLL, M.S.; CRASS, B.A.; REISER, R.N. *et al.* A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet*, v. 1, n. 2, p. 1017 – 1021, 1981.

BORELLI, B.M.; FERREIRA, E.G.; LACERDA, I.C.A. *et al.* Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, n. 4, p. 545 – 550, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v37n4/v37n4a26.pdf>>. Acessado em: 12/04/2007.

BRANT, M.C.; FIGUEIREDO, J.B. Prevalência da mastite subclínica e perdas de produção em vacas leiteiras. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 46, n. 6, p. 595 – 606, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Instrução Normativa n. 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 18 de setembro de 2003. Seção 1, p.14. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do>>. Acessado em: 14/09/2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001. n. 7 – E, p. 45 – 53. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/form.php?lang=pt>>. Acessado em: 11/09/2006.

CARDOSO, H.F.T.; SILVA, N.; SENA, M.J. *et al.* Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, v. 29, n. 5, p. 347 – 349, 1999. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/journal/1117997861/home>>. Acessado em: 17/01/2008.

CARMO, G.M.I.; OLIVEIRA, A.A.; DIMECH, C.P. *et al.* Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 – 2004. *Boletim Eletrônico Epidemiológico*, v. 5, n. 6, p. 1 – 7, 2005. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf>. Acessado em: 15/03/2007.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R. *et al.* An outbreak of staphylococcal food poisoning in the municipality of Passos, MG, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 46, n. 4, p. 581 – 586, 2003.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R. *et al.* Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 9 – 14, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/07400020>>. Acessado em: 25/08/2006.

CARMO, L.S. *Produção e purificação das enterotoxinas estafilocócicas A, B, C e D*. 1997. 177f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CARMO, L.S.; BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). *Revista de Microbiologia*, v. 21, n. 4, p. 320 – 323, 1990.

CASMAN, E.P.; BERGDOLL, M.S.; ROBINSON, J. Designation of staphylococcal enterotoxins. *Journal of Bacteriology*, v. 85, n. 3, p. 715 – 716, 1963. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/reprint/85/3/715.pdf>>. Acessado em: 11/08/2006.

CUNNIFF, P. (Ed.) *Official methods of analysis of the AOAC International*. 16 ed. Virginia: Association of Official Analytical Chemistry International, 1995, cap.17, p.32–34.

DE BUYSER, M.L.; LOMBARD, B.; SCHULTEN, S.M. *et al.* Validation of EN ISO standard methods 6888 Part 1 and Part 2: 1999 – Enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.83, n. 2, p. 185 – 194, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/01681605>>. Acessado em: 21/08/2006.

DE BUYSER, M.L.; AUDINET, N.; DELBART, M.O. *et al.* Comparison of selective media to enumerate coagulase-positive staphylococci in cheeses made from raw milk. *Food Microbiology*, v. 15, n. 3, p. 339 – 346, 1998.

DESMARCHELIER, P.M.; HIGGS, G.M.; MILLS, L. *et al.* Incidence of coagulase positive *Staphylococcus* on beef carcasses in three Australian abattoirs. *International Journal of Food Microbiology*, v. 47, n. 3, p. 221 – 229, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/01681605>>. Acessado em: 11/08/2006.

DEVOYOD, J.J.; MILLET, L.; MOCQUOT, G. Un milieu gélose pour le dénombrement direct de *Staphylococcus aureus*: Milieu au plasma du porc pour *Staphylococcus aureus* (PPSA). *Canadian Journal of Microbiology*, v. 22, n. 11, p. 1603 – 1611, 1976.

- DEVRIESE, L.A. Baird-Parker medium supplemented with acriflavine, polymixins and sulfonamide for the selective isolation of *Staphylococcus aureus* from heavily contaminated materials. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 50, n. 2, p. 531 – 537, 1981.
- DEVRIESE, L.A.; DERYCKE, J. *Staphylococcus hyicus* in cattle. *Research in Veterinary Science*, v. 26, n. 3, p. 356 – 358, 1979.
- DEVRIESE, L.A.; HÁJEK, V.; OEDING, P. *et al.* *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 28, n. 4, p. 482 – 490, 1978.
- DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n. 1, p. 16 – 34, 2000. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/cgi/reprint/13/1/16.pdf>>. Acessado em: 29/01/2008.
- DZIEWANOWSKA, K.; EDWARDS, V.M.; DERINGER, J.R. *et al.* Comparison of the β -Toxins from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 335, n. 1, p. 102 – 108, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00039861>>. Acessado em: 31/08/2006.
- EDWARDS, K.J.; KAUFMANN, M.E.; SAUNDERS, N.A. Rapid and accurate identification of coagulase-negative staphylococci by real time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 9, p. 3047 – 3051, 2001. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/reprint/39/9/3047.pdf>>. Acessado em: 29/08/2006.
- ELEY, A.R. Toxic bacterial food poisoning. In: ELEY, A.R. (Ed.). *Microbial food poisoning*. London: Chapman and Hall, 1992, cap. 3, p. 37 – 55.
- EVENSON, M.L.; HINDS, M.W.; BERNSTEIN, R.S. *et al.* Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 7, n. 4, p. 311 – 316, 1988.
- GERMANO, P.M.L.; MIGUEL, M.; MIGUEL, O. *et al.* Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. *Higiene Alimentar*, v. 7, n. 27, p. 6 – 11, 1993.
- 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” comercializados em Piracicaba – SP. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 15, n. 2, p. 158 – 161, 1995.
- HÁJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 26, n. 4, p. 401 – 408, 1976.
- HAUSCHILD, A.H.W.; PARK, C.E.; HILSHEIMER, R. A modified pork plasma agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 25, n. 9, p. 1052 – 1057, 1979.
- HIROOKA, E.Y.; MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C. *et al.* Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. *International Journal of Food Microbiology*, v. 7, n. 3, p. 185 – 191, 1988.

- HOLBROOK, R.; ANDERSON, J.M.; BAIRD-PARKER, A.C. The performance of a stable version of Baird-Parker's medium for isolating *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 32, n. 2, p. 187 – 192, 1969.
- HOLMBERG, S.D.; BLAKE, P.A. Staphylococcal food poisoning in the United States: new facts and old misconceptions. *Journal of American Medical Association*, v. 251, n. 4, p. 487 – 489, 1984 .
- HOOVER, D.G.; TATINI, S.R.; MALTAIS, J.B. Characterization of staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 46, n. 3, p. 649 – 660, 1983.
- INGHAM, S.C.; LOSINSKI, J.A.; DROPP, B.K. *et al.* Evaluation of *Staphylococcus aureus* growth potential in ham during a sow-cooking process: use of predictions derived from the U.S. Department of Agriculture Pathogen Modeling Program 6.1 predictive model and an inoculation study. *Journal of Food Protection*, v. 67, n. 7, p. 1512 – 1516, 2004.
- INGHAM, S.C.; BECKER, K.T.; FANSLAU, M. A. Comparison of the Baird-Parker agar and 3M Petrifilm Staph Express count plate methods for enumeration of *Staphylococcus aureus* in naturally and artificially contaminated foods. *Journal of Food Protection*, v. 66, n. 11, p. 2151 – 2155, 2003.
- ISIGIDI, B.K.; DEVRIESE, L.A.; CROEGAERT, T.H. *et al.* A highly selective two-stage isolation method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 66, n. 5, p. 379 – 384, 1989.
- JABLONSKI, L.M.; BOHACH, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (Eds.). *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington, D. C.: ASM Press, 1997, cap. 19, p. 353 – 375.
- JARRAUD, S.; PEYRAT, M.A.; LIM, A. *et al.* Correction. *Journal of Immunology*, v. 166, n. 6, p. 4260, 2001b. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/166/6/4260>>. Acessado em: 17/01/2008.
- JARRAUD, S.; PEYRAT, M.A.; LIM, A. *et al.* *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Immunology*, v. 166, n. 1, p. 669 – 677, 2001a. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/166/1/669>>. Acessado em: 17/01/2008.
- JAY, J.M. Staphylococcal gastroenteritis. In: JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. *Modern food microbiology*. 7. ed. New York: Springer, 2005, cap. 23, p. 545 – 566.
- JOHNSTON, A.M. Veterinary sources of foodborne illness. *Lancet*, v. 336, n. 8719, p. 856 – 858, 1990.
- 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. *Epidemiology and Infection*, v. 113, n. 1, p. 75 – 81, 1994.
- KLOSS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. Genus IV *Staphylococcus* Rosenbach 1884. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. *et al.* (Eds.). *Bergey's manual[®] of determinative bacteriology*. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1984, v. 2, section 12, p. 1013 – 1035.

- KLOSS, W.E. Systematics and natural history of staphylococci. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, v. 69, n. 19, p. 25S – 37S, 1990.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL JR., V.R. *et al.* *Diagnóstico microbiológico*. Texto e atlas colorido, 2. ed. São Paulo: Panamericana; 1993, cap. 7, p. 280 – 281.
- LAMAITA, H.C. *Frequência de espécies de Staphylococcus, de TSST-1 e de enterotoxinas estafilocócicas em leite cru refrigerado em propriedades de Minas Gerais*. 2003 enc. 73 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, v. 2, n. 1, p. 63 – 76, 2003. Disponível em: <<http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol1-2/pdf/sim0009.pdf>>. Acessado em: 12/04/2007.
- MARSHALL, R.T. (Ed.) *Standard methods for the examination of dairy products*. 16. ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 1992, 546 p.
- MERRIL, G.A.; WERNER, S.B.; BRYANT, R.G. *et al.* Staphylococcal food poisoning associated with an Easter egg hunt. *Journal of American Medical Association*, v. 252, n. 8, p. 1019 – 1022, 1984.
- NEWSOME, R.L. *Staphylococcus aureus*. *Food Technology*, v. 42, n. 4, p. 194 – 195, 1988.
- OLLIS, G.W.; RAWLUK, S.A.; SCHOONDERWOERD, M. *et al.* Detection of *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk using modified Baird-Parker culture media. *Canadian Veterinary Journal*, v. 36, n. 10, p. 619 – 623, 1995.
- ORWIN, P.M.; LEUNG, D.Y.; DONAHUE, H.L. *et al.* Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 1, p. 360 – 366, 2001. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/reprint/69/1/360.pdf>>. Acessado em: 21/01/2008.
- 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). *Journal of Food Protection*, v. 59, n. 4, p. 390 – 397, 1996.
- 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. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 32, n. 9, p. 723 – 727, 1986.
- PERALES, I.; GARCIA, M.I. The influence of pH and temperature on the behaviour of *Salmonella enteritidis* phage type 4 in homemade mayonnaise. *Letters in Applied Microbiology*, v. 10, n. 1, p. 19 – 22, 1990.
- PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J. *et al.* Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. *Journal of Food Protection*, v. 59, n. 5, p. 559 – 561, 1996.
- PETRIFILM™ Staph Express Count Plate - Interpretation Guide. 2004. Disponível em: <http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/Microbiology/FoodSafety/products/documentation/>. Acessado em: 20/06/2007.

- PINTO, P.S.A.; GERMANO, M.I.S.; GERMANO, P.M.L. Queijo Minas: problema emergente de vigilância sanitária. *Higiene Alimentar*, v. 10, n. 44, p. 22 – 27, 1996.
- REYNAUD, A.; GIRAUDON, N.; DUGOUR, L. *et al.* Comparaison de deux milieux de culture pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (SCP) et mise évidence de l'entérotoxine H dans quatre fromages français contaminés par des SCP. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v. 148, n. 8 – 9, p. 705 – 712, 1997.
- ROBERSON, J.R.; FOX, L.K.; HANCOCK, D.D. *et al.* Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 57, n. 1, p. 54 – 58, 1996.
- SABIONI, J.G.; NASCIMENTO, D.; PEREIRA, J.L. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo Minas em Ouro Preto (MG), 1992. *Higiene Alimentar*, v. 8, n. 33, p. 22 – 23, 1994.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265 p.
- SAWHNEY, D. The toxicity of potassium tellurite to *Staphylococcus aureus* in rabbit plasma fibrinogen agar. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 61, n. 2, p. 149 – 155, 1986.
- SCHOELLER, N.P.; INGHAM, S.C. Comparison of the Baird-Parker agar and 3MTM PetrifilmTM rapid *S. aureus* count plate methods for detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*, v. 18, n. 6, p. 581 – 587, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/07400020>>. Acessado em: 21/08/2006.
- SENA, M.J.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; GLÓRIA, M.B.A. *et al.* Detecção de toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) a partir de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijo coalho comercializados em Recife – PE. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 16. 1998, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 1999. p. 234 – 237.
- SILBERNAGEL, K.M.; JECHOREK, R.P.; CARVER, C.N. *et al.* 3MTM PetrifilmTM Staph Express Count plate method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected dairy foods: collaborative study. *Journal of AOAC International*, v. 86, n. 5, p. 963 – 970, 2003. Disponível em: <http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/Microbiology/FoodSafety/products/documentation/>. Acessado em: 25/02/2007.
- SILVA, B.O.; CARAVIELLO, D.Z.; RODRIGUES, A.C. *et al.* Evaluation of Petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* from milk samples. *Journal of Dairy Science*, v. 88, n. 8, p. 3000 – 3008, 2005. Disponível em: <<http://jds.fass.org>>. Acessado em: 14/02/2007.
- SOMPOLINSKY, D. De l'Impetigo contagiosa suis et du *Micrococcus hyicus* n. sp. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, v. 95, n. 5, p. 302 – 309, 1953.
- STADHOUDERS, J.; HASSING, F.; VAN AALST-VAN MAREN, N.O. A pour-plate method for the detection and enumeration of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in the Baird-Parker medium without egg yolk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, v. 30, n. 4, p. 222 – 229, 1976.
- STAMFORD, T.L.M.; SILVA, C.G.M.; MOTA, R.A. *et al.* Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 1, p. 41 – 45, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n1/28846.pdf>>. Acessado em 31/08/2006.

- SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Detection of staphylococcal enterotoxin H by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Food Protection*, v. 59, n. 3, p. 327 – 330, 1996.
- TALAN, D.A.; STAATZ, D.; STAATZ, A. *et al.* Frequency of *Staphylococcus intermedius* as human nasopharyngeal flora. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 27, n. 10, p. 2393, 1989b.
- TALAN, D. A.; STAATZ, D.; STAATZ, A. *et al.* *Staphylococcus intermedius* in canine gingiva and canine- inflicted human wound infections: laboratory characterization of a newly recognized zoonotic pathogen. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 27, n. 1, p. 78 – 81, 1989a. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/reprint/27/1/78.pdf>>. Acessado em: 05/09/2006.
- TASSINARI, A.R.; NODA, P.K.; FRANCO, G. M. *et al.* Express evaluation – An evaluation of 3M Petrifilm Staph Express count system for enumerating coagulase-positive *Staphylococcus*. *Food Quality*, dec/jan, 2005. Disponível em: <http://www.foodquality.com/mag/12012005/fq_12012005_IL1.htm>. Acessado em: 23/09/2007.
- VALLE, J.; GOMEZ-LUCIA, E.; PIRIZ, S. *et al.* Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n. 5, p. 1323 – 1326, 1990.
- VAN AMSON, G.V.; HARACEMIV, S.M. C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrência/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 30, n. 6, p. 1139 – 1145, 2006. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/revista/30_6/art16.pdf>. Acessado em: 09/03/2007.
- VERAS, J.F. *Identificação por PCR de genes para produção de SEA, SEB, SEC e SED em linhagens de Staphylococcus sp. isolados de surtos de toxinfecção alimentar por leite e derivados*. 2004 enc. 80 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- WHEELER, J.G.; SETHI, D.; COWDEN, J.M. *et al.* Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. *British Medical Journal*, v. 318, n. 7190, p. 1046 – 1050, 1999. Disponível em: <<http://www.bmj.com/cgi/content/full/318/7190/1046>>. Acessado em: 17/12/2007.
- ZANGERL, P. Comparison of Baird-Parker agar and rabbit plasma fibrinogen medium for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in raw milk and raw milk products. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, v. 50, n. 1, p. 4 – 9, 1999.
- ZEBOVITZ, E.; EVANS, J.B.; NIVEN JR., C.F. Tellurite-glycine agar: a selective plating medium for the quantitative detection of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Bacteriology*, v. 70, n. 6, p. 686 – 690, 1955.

ANEXO

Contagem bacteriana nos meios Petrifilm™ Staph Express, Baird-Parker e Baird-Parker RPF de acordo com a concentração do inóculo

Tabela 4. Média de contagem de *Staphylococcus intermedius* de acordo com a concentração do inóculo.

| Concentração inóculo | Log ₁₀ UFC/mL (média ± dp) | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|-------------|-------------|
| | PSE | BP | RPF |
| Alta (10 ⁷ UFC/mL) | 7,24 ± 0,23 | 7,53 ± 0,18 | 7,45 ± 0,28 |
| Média (10 ⁴ UFC/mL) | 4,61 ± 0,24 | 4,91 ± 0,20 | 4,92 ± 0,14 |
| Baixa (10 ² UFC/mL) | 2,89 ± 0,15 | 3,04 ± 0,16 | 3,08 ± 0,12 |

Tabela 5. Média de contagem de *Staphylococcus hyicus* de acordo com a concentração do inóculo.

| Concentração inóculo | Log ₁₀ UFC/mL (média ± dp) | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|-------------|-------------|
| | PSE | BP | RPF |
| Alta (10 ⁷ UFC/mL) | 7,44 ± 0,16 | 7,57 ± 0,15 | 7,52 ± 0,20 |
| Média (10 ⁴ UFC/mL) | 4,84 ± 0,14 | 4,97 ± 0,14 | 4,87 ± 0,29 |
| Baixa (10 ² UFC/mL) | 2,92 ± 0,16 | 3,11 ± 0,12 | 3,11 ± 0,11 |

Tabela 6. Média de contagem de *Staphylococcus aureus* de acordo com a concentração do inóculo.

| Concentração inóculo | Log ₁₀ UFC/mL (média ± dp) | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|-------------|-------------|
| | PSE | BP | RPF |
| Alta (10 ⁷ UFC/mL) | 7,45 ± 0,05 | 7,89 ± 0,05 | 7,80 ± 0,06 |
| Média (10 ⁴ UFC/mL) | 4,76 ± 0,14 | 5,04 ± 0,16 | 5,00 ± 0,10 |
| Baixa (10 ² UFC/mL) | 2,96 ± 0,19 | 3,22 ± 0,13 | 3,10 ± 0,10 |