

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

ARIOSVANA FERNANDES LIMA

***Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA E ENTEROTOXINAS EM QUEIJO DE
COALHO**

FORTALEZA

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ARIOSVANA FERNANDES LIMA

***Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA E ENTEROTOXINAS EM QUEIJO DE
COALHO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADORA: EVÂNIA ALTINA TEIXEIRA DE FIGUEIREDO

FORTALEZA

2005

ARIOSVANA FERNANDES LIMA

***Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA E ENTEROTOXINAS EM QUEIJO DE
COALHO**

Esta dissertação foi submetida a exame como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos, outorgada pela Universidade Federal do Ceará.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo, Dra.

ORIENTADORA

Pesquisadora Renata Tieko Nassu, Dra.

Embrapa Agroindústria Tropical

Prof. Geraldo Arraes Maia, Dr.

Universidade Federal do Ceará

Aos meus pais João Gonçalves
e Maria Diuzete pelo amor,
incentivo e presença constante.

Aos meus irmãos e sobrinhos.

Ao meu amor Venicio pelo apoio
e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Meu sincero respeito e minha gratidão:

A Deus por sempre ter guiado a minha vida;

Aos meus pais por sempre estarem ao meu lado nos momentos difíceis;

Ao meu irmão Ariosvan e família pelo apoio durante o curso;

Ao meu namorado Venicio pelo amor e incentivo sempre demonstrado;

A minha orientadora, Prof^a. Evânia Altina, pela orientação que levaram-me a descoberta de novos conhecimentos e por quem tenho admiração;

A pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Maria de Fátima Borges pela colaboração e sugestões;

Ao Instituto Centro de Ensino Tecnológico, CENTEC pelo apoio para realização deste curso;

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, FUNCAP pelo apoio financeiro;

As funcionárias do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Neuma Pinheiro e Maria Valzenelha pela colaboração durante as análises;

As bolsistas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Mônica Correia, Eliane pela colaboração na realização das análises. E a Alice, Anna Rafaela e Danielle pela amizade e apoio;

As amigas Amanda Mazza, Ângela Borges, Stella Arcanjo e Regianne Melo pelo companheirismo, amizade e o compartilhar de experiências;

Aos professores do curso pelo partilhar de conhecimentos;

Ao secretário do curso Paulo Mendes pela eficiência e atenção;

A todos que contribuíram para a concretização deste trabalho.

RESUMO

Avaliou-se a incidência de *Staphylococcus* sp. e *Staphylococcus* coagulase positiva em 80 amostras de queijos de coalho artesanal e industrial, comercializados em diversos pontos de venda em Fortaleza-Ceará, bem como a detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijos de coalho e nas cepas isoladas de *Staphylococcus* coagulase positiva. Das 80 amostras de queijos de coalho analisadas, 44 (55%) foram de produção artesanal, sendo 33 (41,25%) amostras do Ceará e 11 (13,75%) de outros estados; 13 (16,25%) industrializados com registro do SIE e 23 (28,75%) industrializados com registro do SIF. A incidência de *Staphylococcus* sp. nas amostras analisadas de queijos de coalho artesanais do Ceará, de outros estados e nas amostras de queijos de coalho industriais com registro do SIE, foi de 100%; com exceção de apenas uma (4,35%) amostra de queijo de coalho industrializado com registro do SIF que não apresentou contagem de *Staphylococcus* sp. A incidência de amostras com *Staphylococcus* sp. ocorreu em: 33 amostras artesanais do Ceará, variando de $6,0 \times 10^4$ UFC/g a $8,9 \times 10^7$ UFC/g; em 11 amostras de queijos artesanais de outros estados, variando de $2,2 \times 10^5$ a $8,9 \times 10^7$ UFC/g; em 13 amostras de queijos industriais com SIE, variando de $2,2 \times 10^5$ a $1,9 \times 10^7$ UFC/g; em 22 amostras de queijos industriais com SIF, variando de $9,0 \times 10^4$ a $4,3 \times 10^7$ UFC/g. Esses resultados mostram uma porcentagem significativa (95,65%) de *Staphylococcus* sp. para os queijos industrializados. No entanto, os níveis de contaminação para *Staphylococcus* coagulase positiva nos queijos de coalho analisados foram de: 23 (53,49%) amostras artesanais do Ceará, com contagens entre $1,2 \times 10^5$ a $5,9 \times 10^7$ UFC/g; 7 (16,28%) amostras artesanais de outros estados com contagens entre $6,9 \times 10^5$ a $2,6 \times 10^7$ UFC/g; 9 (20,93%) amostras para queijos industriais com SIE, com contagens entre $4,4 \times 10^4$ a $1,7 \times 10^7$ UFC/g; 4 (9,30%) amostras para queijos de coalho industriais com SIF com contagens entre $4,7 \times 10^5$ a $2,7 \times 10^6$ UFC/g. Das 43 amostras de queijos de coalho contaminados com *Staphylococcus* coagulase positiva, a maioria (21 amostras) apresentou contagem entre 1×10^6 a 1×10^7 UFC/g. A alta incidência de *Staphylococcus* coagulase positiva colocam em risco a saúde do consumidor. Para as análises de enterotoxinas estafilocócicas, foram obtidos 43 extratos das amostras de queijos de coalho contaminadas e 12 extratos de "pools" de cepas selecionadas de *Staphylococcus* coagulase positiva, para serem submetidas à detecção de enterotoxinas estafilocócicas pelo método ELFA no sistema VIDAS® da bioMérieux. Não foram detectadas enterotoxinas estafilocócicas em nenhuma das 43 amostras de queijos de coalho artesanal e industrial, apesar das elevadas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva. Dos 12 pools de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva submetidos à detecção de enterotoxinas, somente um pool (8,33%) de cepas foi capaz de produzir enterotoxinas estafilocócicas. Esses resultados evidenciam a necessidade de orientação aos produtores com relação à qualidade da matéria-prima, condições adequadas de higiene e manipulação na fabricação de queijo artesanal; e uma maior atenção e fiscalização por parte dos órgãos responsáveis, no sentido de implementar medidas mais rígidas de controle no processamento desse produto, incluindo Boas Práticas de Fabricação em toda a cadeia de produção para a garantia da qualidade dos produtos oferecidos ao consumidor e para manutenção da saúde pública.

ABSTRACT

It was evaluated the incidence of *Staphylococcus* sp. and *Staphylococcus* positive-coagulase in 80 samples of industrialized and artisanal “coalho” cheese commercialized in several selling points in Fortaleza-Ceará, as well the detection of staphylococcal enterotoxins in “coalho” cheese samples and in the isolated strains of *Staphylococcus* positive-coagulase. From the 80 samples of “coalho” cheese analysed, 44 (55%) were artisanal produced, being 33 (41,25%) samples of Ceará and 11 (13,75%) from other states; 13 (16,25%) industrialized with State Inspection Service (SIE) register and 23 (28,75%) industrialized with Federal Inspection Service (SIF) register. The incidence of *Staphylococcus* sp. in the analyzed samples of artisanal “coalho” cheese from Ceará, from other states and in the samples of industrialized “coalho” cheese with SIE, was of 100%; except for one unique (4,35%) industrialized “coalho” cheese sample with SIF register, which didn't presented count of *Staphylococcus* sp. The incidence of samples with *Staphylococcus* sp. occurred in: 33 Ceará artisanal samples, varying from $6,0 \times 10^4$ to $8,9 \times 10^7$ UFC/g; in 11 samples of artisanal cheese from other states, varying from de $2,2 \times 10^5$ a $8,9 \times 10^7$ UFC/g; in 13 samples of industrialized cheese with SIE, varying from $9,0 \times 10^4$ a $4,3 \times 10^7$ UFC/g. These results showed a significative percentage (95,65%) of *Staphylococcus* sp. to the industrialized cheese. However, the contamination levels of *Staphylococcus* positive-coagulase in the analyzed “coalho” cheese were of: 23 (53,49%) artisanal Ceará cheese samples, with counts from $1,2 \times 10^5$ to $5,9 \times 10^7$ UFC/g; 7 (16,28%) artisanal samples from other states with counts from $6,9 \times 10^5$ to $2,6 \times 10^7$ UFC/g; 9 (20,93%) samples to the industrialized SIE register cheeses, with counts from $4,4 \times 10^4$ to $1,7 \times 10^7$ UFC/g; 4 (9,30%) samples to the industrialized “coalho” with SIF with counts from $4,7 \times 10^5$ to $2,7 \times 10^6$ UFC/g. From the 43 samples of “coalho” cheese contaminated with *Staphylococcus* positive-coagulase, the majority (21 samples) presented counts from 1×10^6 to 1×10^7 UFC/g. The high incidence of *Staphylococcus* positive-coagulase puts the consumer's health in risk. For the staphylococcal enterotoxins analysis, there were obtained 43 extracts from the “coalho” cheese contaminated samples and 12 extracts of selected strain pools of *Staphylococcus* positive-coagulase, to be submitted to the detection of staphylococcal enterotoxins by the ELFA method in the VIDAS[®] system of bioMérieux. In spite the high counts of *Staphylococcus* positive-coagulase, no staphylococcal enterotoxins were detected in any of the 43 samples of industrialized and artisanal “coalho” cheese. From the 12 strains pools of *Staphylococcus* positive-coagulase submitted to the detection of enterotoxins, only one strain pool (8,33%) was able to produce staphylococcal enterotoxins. These results indicate the need to orient the producers concerning to the raw material's quality, suitable hygienic conditions and manipulation in the manufacturing of artisanal cheese; and a greater attention and fiscalization by the responsible organs, in order to practice the implementation of more rigid actions in the processing of this product, including Good Manufacturing Practices in the whole production chain for the guaranty of the products' quality offered to the consumer and for the maintenance of the public health.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1 Representação esquemática do Método ELFA no sistema mini VIDAS®	50
2 Reação do teste de coagulase.....	57
3 Representação esquemática da metodologia de preparação da amostra e diluições, isolamento e identificação das cepas de <i>Staphylococcus</i> sp. para amostras de queijos.....	59

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
1 Fatores de crescimento e produção de enterotoxinas para <i>S. aureus</i>	19
2 Ocorrência de <i>Staphylococcus</i> sp., <i>S. aureus</i> e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (SCP) em queijo de coalho.....	28
3 Relatos de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no estado do Ceará em 2003.....	39
4 Relatos de surtos de intoxicação estafilocócica envolvendo produtos lácteos no período de 1998 a 2002.....	40
5 Métodos imunológicos para toxinas bacterianas.....	46
6 Kits para detecção de enterotoxinas de <i>S. aureus</i>	51
7 Incidência de <i>Staphylococcus</i> sp. (UFC/g) em amostras de queijos de coalho artesanais e industriais.....	65
8 Incidência de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g) em amostras de queijos de coalho artesanais e industriais.....	68
9 Resultados da detecção de enterotoxinas estafilocócicas através do Método ELFA no aparelho Mini VIDAS em amostras de queijos de coalho artesanais e industriais.....	73
10 Resultados da detecção de enterotoxinas estafilocócicas através do Método ELFA no aparelho Mini VIDAS em cepas isoladas de queijos de coalho artesanais e industriais contaminados com <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	75

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 Características gerais do gênero <i>Staphylococcus</i>	17
3.2 Enterotoxinas estafilocócicas.....	21
3.3 Características do queijo de coalho.....	24
3.4 Incidência de <i>Staphylococcus</i> em leite <i>in natura</i> e queijo de coalho.....	26
3.4.1 Leite <i>in natura</i>	26
3.4.2 Queijo de coalho.....	27
3.5 Produção de enterotoxinas por espécies do gênero <i>Staphylococcus</i>	33
3.6 Surtos de intoxicação alimentar causados por <i>Staphylococcus</i> em produtos lácteos.....	38
3.7 Métodos analíticos na detecção das enterotoxinas estafilocócicas.....	43
3.7.1 Métodos imunológicos tradicionais.....	44
3.7.2 Métodos imunológicos mais sensíveis.....	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 Coleta e transporte das amostras.....	54
4.2 Preparo das amostras e diluições.....	54
4.3 Isolamento.....	54

4.4 Identificação	55
4.4.1 Crescimento em ágar inclinado.....	55
4.4.2 Coloração de Gram.....	56
4.4.3 Teste de coagulase.....	56
4.4.4 Teste de Dnase.....	57
4.4.5 Teste de catalase.....	57
4.5 Cálculo dos resultados	58
4.6 Detecção de enterotoxinas em queijos de coalho artesanais e industriais contaminados com <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	60
4.6.1 Preparo das amostras de queijos de coalho para obtenção dos extratos para análises de enterotoxinas.....	60
4.7 Detecção de enterotoxinas em cepas de estafilococos coagulase positivas isoladas de queijos de coalho artesanais e industriais contaminados....	61
4.7.1 Preparo das cepas de estafilococos coagulase positivas isoladas de queijos de coalho artesanais e industriais contaminados, para obtenção dos extratos para as análises de enterotoxinas.....	61
4.8 Resultados e interpretação do teste de enterotoxinas estafilocócicas no aparelho mini VIDAS®	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 Incidência de <i>Staphylococcus sp.</i> (UFC/g) em amostras de queijos de coalho artesanais e industriais	64
5.2 Incidência de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> em amostras de queijos de coalho artesanais e industriais	67
5.3 Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijos de coalho artesanais e industriais	72

5.4 Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em cepas isoladas de queijos de coalho artesanais e industriais contaminados com <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	74
6 CONCLUSÕES.....	76
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

A produção artesanal e industrial de queijo de coalho é tradicional em vários municípios no estado do Ceará, como também em outros estados do Nordeste (PE, PB e RN) do Brasil. A maior parte da fabricação, ainda é artesanal e o queijo é feito com leite cru. O nome queijo de coalho é derivado do fato desse produto ser elaborado a partir da coagulação do leite pela ação do coalho, que é extraído do quarto estômago (abomaso) de pequenos animais como, por exemplo, cabrito, bezerro, preá, mocó, o qual é denominado coagulador ou *abomasum* quando devidamente preparado (AQUINO, 1983 apud BENEVIDES, 1999).

De acordo com Burkhalter (1981) e Kalantzopoulos (1993) citado por ICMSF (1998), são produzidas em todo o mundo, entre 400 a 1000 variedades de queijos. As diferenças entre as variedades são o resultado de modificações feitas em um ou mais passos básicos da fabricação de queijos. Como sempre, até hoje variações são observadas para alguns tipos de queijo dependendo do fabricante, da origem e do tipo de leite usado (ICMSF, 1998).

A fabricação de queijo de coalho artesanal no estado do Ceará concentra-se principalmente em indústrias de pequeno e médio porte, nas regiões do Vale do Jaguaribe (Morada Nova, Russas, Jaguaribe, Jaguaretama), Inhamuns (Tauá e Crateús) e Sertão Central (Quixadá, Quixeramobim) (NASSU et al., 2001). Os queijos provenientes de diferentes municípios do interior do estado chegam a Fortaleza na maioria das vezes refrigerados, pois os mesmos são colocados em freezers após a desenformagem, no local de produção. Durante a comercialização nos pontos de vendas (mercado local) é comum a exposição do produto sobre balcões o dia inteiro a temperatura ambiente, somente à noite os queijos são

armazenados sob refrigeração. No dia seguinte, são retirados novamente da temperatura de refrigeração para venda sob temperatura ambiente.

No estado do Ceará, o mercado consumidor dos pequenos produtores é principalmente, a cidade de Fortaleza onde a comercialização é feita nas feiras, mercados, supermercados e padarias. O número de unidades produtoras de queijos de coalho artesanais varia de acordo com a safra do leite, o que leva os comerciantes a comprarem queijos artesanais de outros estados como Maranhão e Pará, de onde toda semana os queijos chegam refrigerados, em grandes quantidades, transportados em caminhões. Alguns alegam ainda, que a quantidade de queijo de coalho produzida no Ceará não é suficiente para atender o mercado consumidor, como também os preços são mais elevados do que os queijos provenientes dos outros estados.

Em alguns países, como nos Estados Unidos, a legislação exige a pasteurização do leite destinado à produção de queijo mole, no entanto se o queijo for maturado por 60 dias, não é necessário. Mesmo assim, a produção de queijo de leite cru continua em muitas partes do mundo, e em alguns casos não inclui 60 dias de maturação. A produção de queijo que tiver sido elaborada com leite cru e com menos de 60 dias de maturação, requer controle de patógenos e outros microorganismos indesejáveis no animal, no leite durante a ordenha, na estocagem e transporte da fazenda a produção (ICMSF, 1998).

No Brasil, de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de queijos, fica excluído da obrigação de ser submetido à pasteurização ou outro tratamento térmico o leite higienizado que se destine à elaboração dos queijos submetidos a um processo de maturação a uma temperatura superior aos 5°C, durante um tempo não inferior a 60 dias (BRASIL, 1996).

O RTIQ de queijo de coalho estabelece que o leite a ser utilizado deverá ser higienizado por meios mecânicos adequados e submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente, para assegurar fosfatase alcalina residual negativa, combinado ou não com outros processos físicos ou biológicos que garantam a inocuidade do produto (BRASIL, 2001b).

Atualmente o queijo de coalho tem sido fabricado a nível industrial em alguns estados das Regiões Norte (Pará), Nordeste (Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte) e Sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro).

De acordo com o setor de estatística do Serviço de Inspeção Federal (SIF) Ceará, atualmente, quatro estabelecimentos têm registro de produção para queijo de coalho. A produção de queijo de coalho no estado do Ceará sob inspeção do SIF durante os períodos de 2003, 2004 e 2005 (até abril) foi de: 162.876 kg; 132.561kg; 45.539 kg, respectivamente (BRASIL, 2005). No entanto a produção de queijo de coalho, por doze estabelecimentos com registro do Serviço de Inspeção Estadual (SIE), foi de 1628 kg até maio de 2005 (informação verbal)¹.

O RTIQ de queijo de coalho (BRASIL, 2001b) elaborado pelo MAPA, estabelece os requisitos mínimos de qualidade que deverá cumprir o queijo de coalho destinado ao consumo humano. No estado do Ceará o queijo de coalho é produzido em indústrias que seguem os requisitos mínimos exigidos pela legislação devendo ser elaborado com leite pasteurizado. Contudo, a produção artesanal, usualmente, é feita a partir de leite cru sem nenhum cuidado higiênico-sanitário, resultando num produto de qualidade microbiológica insatisfatória, o que pode repercutir na saúde do consumidor.

¹Dados fornecidos pelo Serviço de Inspeção Estadual – SIE, Fortaleza, 2005.

Alguns produtores, ainda fazem questão de usar o coalho de verdade, o chamado “livro”, que é o quarto estômago do animal, guardado no soro, onde todo o dia é retirado e substituído por outro soro. Em média, a duração é de três dias, e posteriormente será substituído por outro coalho (CARVALHO, 2003).

Segundo a Delegacia Federal da Agricultura no Ceará, o queijo de coalho produzido de forma artesanal é um dos raros alimentos que conseguem furar a barreira da fiscalização comandada pela mesma (TARELHO, 2003).

Algumas instituições de ensino e pesquisas estão em parceria através de projetos de pesquisa, visando o desenvolvimento de tecnologias para agregar valor e preservar a identidade de queijos regionais do Nordeste, especialmente o queijo de coalho produzido nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. Os queijos terão um selo de qualidade, certificando sua origem sem a descaracterização do produto, já que o mesmo é parte da identidade cultural do povo nordestino (THOMASI, 2003).

A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo de coalho tem sido relatada em várias pesquisas (LEITE JÚNIOR et al., 2000; CUNHA NETO et al., 2002; RAPINI et al., 2002; FEITOSA et al., 2003; BORGES et al., 2003) e pode constituir num risco a saúde pública, pois algumas cepas desse microrganismo produzem uma ou mais enterotoxinas termoresistentes que causam intoxicação estafilocócica alimentar. Em virtude das condições de produção, ausência de boas práticas, este produto não apresenta segurança alimentar a saúde pública exigindo maior atenção por parte dos órgãos oficiais ao controle higiênico-sanitário do produto.

2 OBJETIVOS

- Determinar a incidência de *Staphylococcus* sp. em queijo de coalho artesanal e industrial;
- Detectar a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo de coalho artesanal e industrial;
- Submeter as cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de queijo de coalho à detecção de enterotoxinas;
- Identificar a presença da toxina nos queijos de coalho analisados, dos quais foram isolados *Staphylococcus* coagulase positiva.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características gerais do gênero *Staphylococcus*

A primeira descrição do *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) foi feita numa série de artigos publicados entre 1879 e 1872 por um cirurgião escocês Alexander Ogston, como causa de algumas infecções piogênicas em humanos. Em 1882 deram o nome estafilococos (do grego: *Staphyle*, cacho de uvas e *coccus* um grão de baga) pelo aspecto apresentado ao observá-los ao microscópio (ADAMS; MOSS, 1997).

O gênero *Staphylococcus* tem despertado interesse entre os microbiologistas desde os tempos de Pasteur e Koch (1880-1884). Acredita-se que a primeira observação registrada, associando estafilococos com intoxicação alimentar, foi provavelmente feita por Vaughan e Sternberg que em 1884, descreveram uma investigação de um importante surto da doença em Michigan causado por queijo contaminado por estafilococos. Entretanto, a relação evidente dos estafilococos com intoxicação alimentar, foi somente estabelecida em 1914, quando Barber demonstrou claramente que os estafilococos eram capazes de causar uma intoxicação alimentar ao consumir leite procedente de uma vaca com mastite estafilocócica. Nesta época, a significância deste trabalho não foi reconhecida, mas em 1930, o papel dos estafilococos em intoxicação alimentar foi redescoberto por Dack e seus colegas, através de experimentos em voluntários humanos (ANDERSON, 1989; ICMSF, 1996; ADAMS; MOSS, 1997).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* que pertencem à família *Micrococaceae* são formadas por um grupo de bactérias pequenas, esféricas,

chamadas de cocos, que dividem-se em planos diferentes e quando visualizadas ao microscópio apresentam-se na forma de cacho de uva, possuindo diâmetro variando de 0,5 a 1,5 μ m, ocorrendo separadamente ou em cadeias curtas, em pares e em grupos irregulares. São típicas Gram positivas, imóveis, não formadoras de esporos. São anaeróbias facultativas, quimiorganotróficas, com maior crescimento sob condições aeróbias, apresentando metabolismo fermentativo e respiratório, produzem catalase, reduzem nitrato a nitrito, são susceptíveis a lise por lisostafina, mas não por lisozima. São mesófilas apresentando temperatura com limite de crescimento entre 7,0 a 48,0°C e uma temperatura ótima de 35 a 37°C. O pH para crescimento ótimo é de 6,0 a 7,0; com limites de mínimo e máximo de 4,0 a 9,8 respectivamente. Atividade de água (A_w) para crescimento é de 0,83 a \leq 0,99; sendo o ótimo 0,98 a \leq 0,99; e para cloreto de sódio (NaCl) o ótimo é de 0,5 a 4,0% (Tabela 1). Usualmente crescem em 10% de NaCl e algumas estirpes são capazes de crescerem em concentrações de até 20% (HOLT et al., 1994; JAY, 1996; ADAMS; MOSS, 1997).

Algumas estirpes desses microrganismos produzem uma toxina altamente termoestável que causa enfermidade no homem. A produção de enterotoxinas estafilocócicas ocorre numa faixa de temperatura entre 10,0 e 45,0°C com ótimo entre 35,0 e 40,0°C. O pH para produção de enterotoxinas é de 5,3 a 6,8 para enterotoxina A e para outras enterotoxinas é de 6,0 a 7,0; para atividade água (A_w) o intervalo é de 0,86 a \leq 0,99. A concentração ótima para NaCl é de 0,5%. Um aspecto de muita importância à saúde pública e para a indústria de alimentos é a termorresistência da toxina estafilocócica, que resiste a 100°C por 30 minutos (ICMSF, 1996; ADAMS; MOSS, 1997; OPAS, 2001).

Na Tabela 1 são apresentados os limites de crescimento e produção de enterotoxinas por *S.aureus*.

Tabela 1 Fatores de crescimento e produção de enterotoxinas por *S.aureus*

Fator	Crescimento		Produção de Enterotoxinas	
	Ótimo	Intervalo	Ótimo	Intervalo
Temperatura (°C)	35 – 37	7 - 48	35 - 40	10 – 45
pH	6,0 – 7,0	4,0 – 9,8	Enterotoxina A 5,3 – 6,8 outras 6,0 – 7,0	4,8 – 9,0
NaCl	0,5 – 4,0%	0 - 20%	0,5%	0 - 20%
Aa	0,98 - □0,99	0,83 - □0,99	□0,99	0,86 - □0,99
Atmosfera	Aeróbica	Aeróbica Anaeróbica	Aeróbica (5-20% O ₂ dissolvido)	Aeróbica Anaeróbica

FONTE: ADAMS; MOSS, 1997 (adaptada).

Segundo o Bergeys's Manual of Determinative Bacteriology (HOLT et al., 1994) o gênero *Staphylococcus* é formado por 28 espécies e 8 subespécies, das quais três subespécies (*S. aureus* subespécie *anaerobius*, *S. aureus* subespécie *aureus*, *S. scheleiferi* subespécie *coagulans*) e três espécies (*S. delphini*, *S. intermedius* e *S. hyicus*) são produtoras de coagulase. No entanto, Kloos e Bannerman (1999) citado por Silva e Gandra (2004) descreveram que o gênero *Staphylococcus* é composto atualmente por 32 espécies, das quais cinco são capazes de produzir a enzima extracelular, coagulase livre. Destas cinco espécies, três (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*) foram descritas como produtoras de enterotoxinas e associadas a surtos de intoxicação alimentar em humanos e são denominadas de estafilococos coagulase positiva, sendo o *S. aureus*, a espécie predominante em casos e surtos de intoxicação alimentar. Além disso, estas três espécies apresentam outras semelhanças, como a capacidade de produzir a enzima termonuclease (JAY, 1992; SILVA; GANDRA, 2004).

O grupo de estafilococos coagulase positiva é o mais importantes pelas seguintes razões: primeiro, porque sua presença em alimentos processados pode indicar deficiência de processamento ou condições inadequadas do processo; segundo, porque suas enterotoxinas, uma vez presentes no alimento, poderão causar intoxicação alimentar (SILVA; GANDRA, 2004).

Segundo Kloos (1990) citado por Pereira et al. (2000) os estafilococos são organismos ubíquos e estão amplamente distribuídos na natureza, na qual o maior habitat inclui a pele, suas glândulas e membranas mucosas de mamíferos e pássaros. Esporadicamente, foram encontrados no solo, partículas de poeira e ar, sedimentos marinhos, águas frescas, esgoto, superfície de plantas, carne, leite e seus derivados e outros alimentos. Sendo o *Staphylococcus* resistente a secagem, pode colonizar equipamento de processamento de alimentos que seja de difícil higienização, nas superfícies expostas aos ambientes. No entanto, Jablonski e Bohach (2001) relataram que os humanos são os principais reservatórios de estafilococos, onde são encontrados em diferentes regiões do corpo como garganta, faringe, glândulas mamárias e trato intestinal e urinário.

Indivíduos colonizados são portadores de *Staphylococcus* para outros indivíduos e para o alimento. A disseminação de *S.aureus* entre humanos e de humanos para alimentos pode ocorrer por contaminação direta, indiretamente por fragmentos de pele, ou através de gotículas do trato respiratório. A primeira das dificuldades associadas com controle de intoxicação alimentar estafilocócica é o grande número de reservatórios humano e animal (JABLONSKI; BOHACH, 2001).

Além do homem, a maioria dos animais domésticos também é portadora ou apresenta-se contaminada pela bactéria. Exemplo típico é a mastite estafilocócica

do gado leiteiro. Caso o leite contaminado seja consumido ou utilizado na fabricação de queijos, poderá ocorrer intoxicação estafilocócica (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Os estafilococos são facilmente destruídos por cozimento, ao contrário das toxinas produzidas por eles que permanecem intactas. Intoxicações alimentares causadas por estafilococos ocorrem geralmente quando um alimento cozido é contaminado pelo manipulador e mantido sob condições de calor (20 – 40°C) por várias horas. Laticínios, carnes cozidas (particularmente o hambúrguer), crustáceos e outros pratos preparados bem antes do consumo são normalmente passíveis de contaminação. Produtos como queijos e salames podem também sofrer uma fermentação inadequada, permitindo que os estafilococos cresçam e produzam toxinas durante a maturação (ICMSF, 1996).

3.2 Enterotoxinas estafilocócicas

De acordo com Bergdoll (1972) citado por Oliveira (1999), alguns estafilococos possuem a capacidade de produzir enterotoxinas, quando inoculados em meio de cultura laboratorial e também em vários alimentos. As enterotoxinas quando ingeridas pelo homem, podem provocar uma síndrome gastroentérica.

Segundo Jablonski e Bohach (2001), o *S. aureus* pode apresentar múltiplas enterotoxinas com pesos moleculares semelhantes como também propriedades biológicas e físico-químicas. As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas de baixo peso molecular (26000 a 34000 Da), de cadeias simples, constituídas de uma cadeia contendo quantidades relativamente grandes de lisina, tirosina, ácido aspártico e ácido glutâmico, e caracterizada por conter somente dois

resíduos de cisteína e um ou dois resíduos de triptofano. São solúveis em água e soluções salinas (ICMSF, 1996).

Maiores avanços na caracterização de enterotoxinas estafilocócicas foram feitos aproximadamente duas décadas após Dack e seus colegas associarem intoxicação estafilocócica alimentar com uma exotoxina. Bergdoll e colegas foram os primeiros investigadores a produzirem preparações purificadas de enterotoxinas estafilocócicas e desenvolverem antisoro específico (JABLONSKI; BOHACH, 2001).

De acordo com Betley et al., em 1990 foi formado um comitê para estabelecer uma nomenclatura alfabética para a classificação das enterotoxinas estafilocócicas que é usada ainda hoje. Baseado nesta nomenclatura, as enterotoxinas são designadas com uma letra do alfabeto na ordem de sua descoberta (apud JABLONSKI; BOHACH, 2001).

Segundo Le Loir, Baron e Gautier (2003) 14 tipos antigênicos de enterotoxinas de estafilococos são reconhecidos atualmente: SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEM, SEN, SEO. São altamente estáveis a temperaturas elevadas e resistem a maior parte das enzimas proteolíticas, tais como pepsina ou tripsina, podendo manter sua atividade no trato digestório, mesmo após a ingestão. A composição de aminoácidos das enterotoxinas SEA, SED e SEE é similar, o mesmo ocorrendo entre a SEB e a SEC.

Além das enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) existe uma toxina previamente designada enterotoxina F, que é atualmente conhecida como responsável pela síndrome do choque tóxico (TSST-1) e não por enterite (FORSYTHE, 2002).

De acordo com Bergdoll (1983) citado por Le Loir, Baron e Gautier (2003), as enterotoxinas estafilocócicas são também altamente resistentes ao calor, sendo

mais termotolerantes quando presentes nos gêneros alimentícios do que em culturas de laboratório.

Conforme ICMSF (1996) a maioria dos surtos de intoxicação alimentar envolve as enterotoxinas “SEA” e “SED”, que são formadas em alimentos dentro de uma maior faixa de pH, Aa e potencial de oxidação que as enterotoxinas “SEB” e “SEC”. Biotipos humanos de *S. aureus* produzem enterotoxinas mais freqüentemente do que aves e outros biotipos animais.

Os surtos são geralmente ocasionados por alimentos que não foram mantidos em temperaturas superiores a 60°C ou refrigerados a temperaturas inferiores a 7,2°C (ADAMS; MOSS, 1997; FORSYTHE, 2002).

Muitos fatores contribuem para a probabilidade de desenvolvimento de sintomas de intoxicação estafilocócica alimentar e sua severidade. Os mais importantes incluem a susceptibilidade do indivíduo à toxina, a quantidade de alimento contaminado ingerido e da saúde geral da pessoa afetada. O tipo de toxina também pode influenciar na probabilidade e severidade da doença. No entanto surtos de intoxicação estafilocócica alimentar atribuídos à ingestão de SEA são muito mais comuns. Indivíduos expostos a SEB apresentam sintomas muito mais severos (JABLONSKI; BOHACH, 2001; FORSYTHE, 2002).

Vários estudos tem sido conduzidos para avaliar o potencial da enterotoxina estafilocócica e a quantidade de toxina requerida para iniciar uma intoxicação estafilocócica alimentar. Um nível basal de aproximadamente 1 ng de enterotoxina estafilocócica por grama de alimento contaminado é suficiente para causar sintomas associados com intoxicação estafilocócica alimentar. De acordo com FDA, doses eficazes de enterotoxinas estafilocócicas podem ser alcançadas

quando populações de *S.aureus* chegam a 10^5 microrganismos por grama de alimento contaminado (JABLONSKI; BOHACH, 2001).

Os alimentos que foram submetidos a tratamentos térmicos (destruição das células bacterianas), devem ser testados quanto à presença de enterotoxinas, já que elas apresentam resistência ao calor e podem persistir no produto final (FORSYTHE, 2002).

Após a ingestão do alimento contendo a toxina pré-formada, o período de incubação de um surto de intoxicação estafilocócica geralmente é de 30 minutos a 8 horas, sendo a média de 2 a 4 horas. Os sintomas mais comuns da intoxicação estafilocócica são náusea, vômito, dores abdominais e diarreia. A recuperação é rápida, normalmente dentro de dois dias. Podem ocorrer em casos muito graves, dores de cabeça, dores musculares, alterações temporárias da pressão arterial e da pulsação, e colapso (ICMSF, 1996; OPAS, 2001; FORSYTHE, 2002).

3.3 Características do queijo de coalho

O queijo de coalho já é um queijo largamente fabricado principalmente nos estados do nordeste do Brasil compreendendo: Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba. Nestes estados, o queijo de coalho se destaca entre os principais tipos de queijos artesanais de fabricação e consumo comprovadamente incorporados à cultura regional de tradição secular, transferida através de gerações.

Segundo estudo do SEBRAE (1998) a composição do queijo de coalho fabricado no estado do Ceará, evidenciada foi a seguinte: O teor de umidade varia de 35,9 a 55%, denominados de massa semidura. O teor de gordura no extrato seco

é de 25 a 59,9% de gordura, sendo considerados semigordo, gordo e extra gordo. O pH está em torno de 4,9 a 6,0. E o teor de cloreto de sódio é de 1,5 a 3,0%.

O RTIQ (Regulamento Técnico de Identidade e qualidade de queijo de coalho) define o Queijo de Coalho, como o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio de coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação. É classificado como queijo de média (entre 36% e 45,9%) a alta umidade (entre 46% e 54,9%), de massa semicozida ou cozida, apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0% e 60%. É permitida a adição de condimento ao queijo desde que seja mencionado no rótulo. O queijo deverá apresentar uma consistência semidura, elástica; uma textura compacta (sem olhaduras mecânicas) ou aberta com olhaduras mecânicas; a cor é branca amarelada uniforme; o sabor brando, ligeiramente ácido e salgado; o odor ligeiramente ácido de coalhada fresca; a casca é fina e não muito bem definida; o formato e o peso são variáveis. O acondicionamento do queijo de coalho deve ser feito em embalagens apropriadas com ou sem vácuo. E para as condições de conservação e comercialização, é especificado que o queijo de coalho deverá ser mantido a uma temperatura não superior a 12°C (BRASIL, 2001b).

Andrade et al. (2005) avaliaram as características físico-químicas de queijos de coalho industriais com serviço de inspeção (quatro amostras) e artesanais (quatro amostras), produzidos no estado do Ceará. Foram evidenciados valores médios para queijos industriais e artesanais respectivamente: umidade 45,06% e 44,52% ; gordura no extrato seco 44,35% e 48,32% ; cloreto de sódio 2,43% e 3,30%; acidez 0,38% e 1,29% ; pH 6,18 e 5,83; Atividade de água 0,97 e 0,96. Os

autores constataram diferenças na composição dos queijos produzidos de forma industrial e artesanal, confirmando a necessidade de padronização das tecnologias de elaboração.

Quanto aos padrões microbiológicos do queijo de coalho, a Resolução-RDC N° 12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001a) estabelece dois níveis de tolerância para estafilococos coagulase positiva para queijo de coalho, em função do teor de umidade: 10^3 UFC/g para amostras de média (36%) e alta (46%) umidade, e de muito alta umidade (55%, com bactérias lácticas abundantes e viáveis). E 5×10^2 UFC/g para amostras de muito alta umidade (55%, incluindo os queijos de coalho com umidade correspondente, e outros elaborados por coagulação enzimática, sem a ação de bactérias lácticas).

No RTIQ de Queijos (BRASIL, 1996) estão estabelecidos os requisitos microbiológicos de queijos. O critério de aceitação para estafilococos coagulase positiva é de 10^3 UFC/g para queijos de média (36% □ umidade □ 46%) e de alta umidade (46% □ umidade □ 55%).

3.4 Incidência de *Staphylococcus* em leite *in natura* e queijo de coalho

3.4.1 Leite *in natura*

No leite e em produtos lácteos, o *S. aureus* é comumente encontrado. Infecções estafilocócicas na glândula mamária do gado leiteiro representam um reservatório significativo de estirpes enterotoxigênicas de *S. aureus*. Enterotoxinas A, B, C e D podem ser produzidas por estafilococos isolados de leite *in natura* (MARSHALL, 1992).

A principal fonte de estirpes enterotoxigênicas de *S. aureus* em leite, é a mastite no úbere do rebanho leiteiro infectado, podendo assim causar surtos de intoxicação alimentar estafilocócica. Em casos de mastite subclínica, níveis de 10^4 a 10^5 UFC/mL são relatados, e até 10^8 UFC/mL em caso de mastite declarada. Antes do uso do resfriamento rápido do leite e da pasteurização se tornar oficial, o leite cru foi envolvido muitas vezes em surtos de intoxicação estafilocócica. A pasteurização destrói o *S.aureus*, mas enterotoxinas pré-formadas não são destruídas por este processo (ICMSF, 1998).

Badini et al. (1996) avaliaram 60 amostras de leite cru comercializado clandestinamente nos municípios de Botucatu e de São Manuel no estado de São Paulo, provenientes de dez produtores rurais. Os resultados obtidos evidenciaram a ocorrência de 30 (50,0%) amostras contaminadas por cepas de estafilococos coagulase positiva e fora dos padrões legais estabelecidos pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 1987).

Em Minas Gerais, Lamaita (2003c) avaliaram a frequência de *Staphylococcus* sp. em 80 amostras de leite *in natura* proveniente de 80 propriedades rurais. A presença de *Staphylococcus* sp. foi observada em 100% das amostras, com contagem média variando de $1,0 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^7$ UFC/mL. Foi verificada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Staphylococcus* coagulase negativa, sendo *S. aureus* a mais frequente (34,6%).

3.4.2 Queijo de coalho

A presença de espécies do gênero *Staphylococcus* em queijo de coalho tem sido evidenciada em alguns estados do Nordeste, como também em outros

estados do Brasil. O *S. aureus* é freqüentemente encontrado em queijos e produtos de laticínios. Várias pesquisas (Tabela 2) sobre a qualidade microbiológica do queijo de coalho relatam a ocorrência de microrganismos do gênero *Staphylococcus*, excedendo na maioria das vezes, os limites estabelecidos pela legislação vigente.

Tabela 2 Ocorrência de *Staphylococcus* sp., *S.aureus* e *Staphylococcus coagulase* Positiva (SCP) em queijo de coalho

<i>Staphylococcus</i> sp. (UFC/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g) (Valor máximo detectado)	Autores
-	2,4 x 10 ⁶ artesanal 1,7 x 10 ⁴ industrial	Paiva; Cardonha, 1999
-	6,5 x 10 ⁷	Hiluy; Araújo, 1999
-	7,8 x 10 ⁵	Florentino; Martins, 1999
-	7,6 log (T ^a ambiente) 7,1 log (T ^a refrigeração)	Leite Júnior et al., 2000
-	2,0 x 10 ⁵	Bastos et al., 2001
-	6,5 x 10 ⁷	Nascimento et al., 2001
-	2,4 x 10 ⁶ (SCP)	Benevides et al., 2001
-	4,3975 log	Benevides; Telles, 2002
2,0 x 10 ⁷	-	Rapini et al., 2002
-	2,0 x 10 ⁹ (SCP)	Borges et al., 2003
-	1,3 x 10 ⁸ (SCP)	Feitosa et al., 2003
6,8 x 10 ⁹	-	Barbosa et al., 2004
-	1,93 log *c/ SI (SCP) 3,28 log **s/ SI (SCP)	Viana et al., 2004

* média com Serviço de Inspeção; ** média sem Serviço de Inspeção.

Mendes et al. (1999) avaliaram a qualidade microbiológica de 105 amostras de queijos de coalho comercializadas em Recife-PE, no período de agosto de 1997 a abril de 1998 procedentes de 15 municípios. Nas amostras do município A, 90% estavam fora do padrão para *S. aureus*, as amostras do município C também apresentaram elevadas contagens de *S. aureus*, com índices superiores ao limite máximo permitido (10³ UFC/g).

Paiva e Cardonha (1999) pesquisaram a qualidade microbiológica de 20 amostras de queijo de coalho, das quais, dez eram artesanais e dez industrializadas com registro do Serviço de Inspeção Estadual (SIE), comercializadas em Natal-RN.

Os resultados encontrados para *S. aureus* em queijos artesanais foram no máximo de $2,4 \times 10^6$ UFC/g e o percentual de amostras em desacordo com os padrões vigentes foi de 30%. No entanto, para os queijos industrializados o valor máximo obtido foi de $1,7 \times 10^4$ UFC/g de *S. aureus*, estando em desacordo com os padrões vigentes apenas 10% das amostras.

Florentino e Martins (1999) avaliaram a qualidade microbiológica de 40 amostras de queijo de coalho artesanal consumido no estado da Paraíba, no período de junho de 1996 a janeiro de 1997. A contagem para *S. aureus* variou de $6,2 \times 10^2$ UFC/g a $5,9 \times 10^5$ UFC/g. Foi evidenciado que 70% das colônias de *S. aureus* isoladas, apresentaram coagulase positiva.

Em Fortaleza-Ceará, Hiluy e Araújo (1999) avaliaram a qualidade microbiológica de 25 amostras de queijos de coalho. A contagem de *S. aureus* variou de 10^2 a $6,5 \times 10^7$ UFC/g, estando 96% das amostras analisadas com valores acima do limite estabelecido pela legislação vigente e consideraram o produto impróprio para o consumo.

Barreto et al. (2000) avaliaram a qualidade microbiológica e higiênico-sanitária de 36 amostras de queijo de coalho de fabricação artesanal em algumas regiões do estado do Ceará, no período de abril de 1999 a maio de 2000, das quais 17 foram suspeitas de intoxicação alimentar. Os resultados mostraram que das 36 amostras analisadas, 25 (69,40%) apresentaram índices elevados para *S. aureus*. Foi destacado que os resultados sugerem condições precárias de higiene durante a fabricação do queijo de coalho artesanal envolvendo possivelmente, local inadequado, manuseio excessivo por parte dos manipuladores, acondicionamento e transporte inadequado; e que esses resultados são compatíveis com o levantamento

de dados epidemiológicos das doenças diarreicas ocorridas nas regiões onde o queijo de coalho artesanal foi fabricado.

Borges et al. (2000) avaliaram a qualidade microbiológica de 43 amostras de queijos de coalho artesanal oriundas de 11 municípios pertencentes a três regiões diferentes do estado do Ceará. As contagens de *S.aureus* variaram de $\square 10$ a $2,0 \times 10^9$ UFC/g, sendo que 73% das amostras obtidas na região do Jaguaribe e 100% das amostras de Tauá / Crateús e Quixadá / Quixeramobim encontravam-se impróprias para consumo. Foi evidenciada a necessidade de orientação aos produtores em relação à qualidade da matéria-prima, manipulação e higiene na fabricação do queijo de coalho, e que nas condições encontradas representa risco a saúde do consumidor.

Leite Júnior et al. (2000) analisaram 18 amostras de queijo de coalho comercializados à temperatura ambiente e sob refrigeração em Campina Grande, no período de abril a julho de 1995. Para as amostras de queijos de coalho comercializados a temperatura ambiente a contagem máxima de *S.aureus* foi de 7,6 log de UFC/g e para as amostras comercializados a temperatura de refrigeração a contagem máxima de *S.aureus* foi de 7,7 log de UFC/g. Foi concluído que 100% das amostras estavam fora dos padrões estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 1987) para *S.aureus*, sendo potencialmente capaz de causar intoxicação alimentar.

Menezes et al. (2000) analisaram 50 amostras de queijos de coalho comercializados no Ceará, provenientes de 15 municípios. Foi evidenciado que 10 (20%) amostras apresentaram *S.aureus* e salientado que esse produto pode causar intoxicação alimentar.

Bastos et al. (2001) inspecionaram uma indústria produtora de queijo de coalho no estado do Ceará, visando à implantação de boas práticas de fabricação.

Foram analisadas cinco amostras de queijo de coalho, que apresentaram para *S. aureus* contagem máxima de $2,0 \times 10^5$ UFC/g, estando acima do limite estabelecido pela legislação (BRASIL, 2001a).

Em Fortaleza-CE, Nascimento et al. (2001) avaliaram as condições higiênico-sanitárias de 17 amostras de queijos de coalho comercializados de diferentes produtores, no período de fevereiro a abril, das quais 11,76% foram positivas para *S. aureus*. O resultado máximo obtido para contagem de *S. aureus* foi de $6,5 \times 10^7$ UFC/g.

Benevides e Telles (2002) avaliaram as características microbiológicas, de 40 amostras de queijo de coalho comercializadas na cidade de Fortaleza-CE, onde 44,44% das amostras analisadas encontravam-se fora dos padrões legais vigentes para *S. aureus*. Foi ressaltado que os principais fatores que contribuíram para contaminação com *S. aureus* foram as más condições gerais dos produtos comercializados em supermercados e feiras livres, podendo associar a esses resultados à falta de higienização no animal, ordenhador, úbere e outros fatores levando a obtenção de matéria prima comprometida do ponto de vista microbiológico e sanitário e conseqüentemente produto de qualidade duvidosa.

Cunha Neto, Silva e Stamford (2002) analisaram três amostras de queijos de coalho processados e comercializados em Recife-PE, das quais duas apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva, com contagens variando de 10^2 a $1,5 \times 10^4$ UFC/g.

Oliveira (2002) analisou 74 amostras de queijo de coalho comercializado em Fortaleza-CE, no período de 1999, 2000 e 2001, quanto à presença de *S. aureus* coagulase positiva, das quais 34 (45,95%) amostras encontravam-se satisfatórias (menor que 5×10^2 UFC/g) e 40 (54,05%) insatisfatórias (maior que 5×10^2 UFC/g).

Foi evidenciado que as amostras de queijos de coalho analisadas estavam contaminadas com *S. aureus* coagulase positiva acima do limite estabelecido pela legislação vigente (5×10^2 UFC/g).

Borges et al. (2003) analisaram 43 amostras de queijos de coalho oriundos das seis microrregiões do Ceará, das quais 90,8% apresentaram estafilococos coagulase positiva, com contagens variando de $1,0 \times 10^1$ a $2,0 \times 10^9$ UFC/g. Foi evidenciado que apenas 2,3% das amostras encontravam-se de acordo com padrões microbiológicos vigentes (BRASIL, 2001a), sendo classificados como produtos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e que não apresentam segurança alimentar.

No Rio Grande do Norte, Feitosa et al. (2003) analisaram 11 amostras de queijo de coalho oriundas de seis microrregiões, e observaram a ocorrência de estafilococos coagulase positiva em 72,7% das amostras com contagens variando de $7,0 \times 10^4$ a $1,3 \times 10^8$ UFC/g. Foi ressaltado que esses valores são considerados elevados e acima do limite permitido pela legislação (5×10^3 UFC/g).

Em Fortaleza-CE, Picanço et al. (2004) enumeraram estafilococos coagulase positiva em 46 amostras de queijo de coalho comercializados em diferentes bairros, onde 100% das amostras apresentaram contagens acima dos limites estabelecidos pela legislação vigente.

Viana et al. (2004) detectaram estafilococos coagulase positiva em 20 amostras de queijo de coalho comercializados em Feira de Santana-BA, sendo dez amostras sem SI (Serviço de Inspeção Estadual ou Federal) e dez com SI. A média dos resultados para estafilococos coagulase positiva obtidos para os queijos com SI foi de 1,93 log UFC/g e para queijos sem SI foi de 3,28 log UFC/g. Foi evidenciado que os queijos sem SI encontravam-se com níveis de estafilococos coagulase

positiva acima do padrão estabelecido (BRASIL, 1996), no entanto 70% das amostras de queijos de coalho com SI estavam de acordo com a legislação.

Guedes Neto et al. (2004) fizeram uma revisão sobre a qualidade físico-química e microbiológica de queijo de coalho e relataram que os dados apresentados nos trabalhos da revisão comprovam a baixa qualidade físico-química e microbiológica do produto, sendo causada não somente pela utilização de leite cru em sua produção, mas também pela ausência de boas práticas de fabricação, tanto em queijos artesanais, quanto em queijos industrializados.

3.5 Produção de enterotoxinas por espécies do gênero *Staphylococcus*

Muitas pesquisas tem sido realizadas para a avaliação do potencial enterotoxigênico e de produção de enterotoxinas por estirpes do gênero *Staphylococcus*.

Sena et al. (1997) analisaram 90 amostras de queijo de coalho no período de janeiro a maio de 1997, em Recife-PE. Foram identificadas 377 cepas de *Staphylococcus*, assim distribuídas: 218 (57,82%) de *S. aureus*; 96 (25,46%) de *S. epidermidis*; 41 (10,87%) de *S. hyicus* e 22 (5,83%) de *S. intermedius*. Os “pools” das cepas foram testados quanto ao potencial de produção de enterotoxinas por indução de produção em condições laboratoriais. Foram identificados os seguintes resultados: dos 78 “pools” de *S. aureus*, 48 (61,5%) produziram enterotoxina B; 10 (12,9%), toxina C e 2 (2,5%), produziram toxina D. Dos 11 “pools” de *S. intermedius*, 7 (63,6%), produziram toxina B e os “pools” de *S. epidermidis* e de *S. hyicus* não produziram enterotoxinas.

Brabes et al. (2000) estudaram 87 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas a partir de leite de animais mastícticos provenientes de propriedades de São Paulo e Minas Gerais. A detecção de enterotoxinas foi realizada através dos testes comerciais RPLA (OXOID) e ELISA (RIDASCREEN). Das 87 cepas testadas, 16 (18%) apresentaram produção de enterotoxinas, sendo destas, dez (62,5%) identificadas como *S. aureus*, cinco (31,25%) como *S. sciuri* e uma (6,25%) como *S. chromogenes*. Dentre as 26 toxinas produzidas, dez (38%) foram identificadas como “SEA”, sete (27%) como “SEB”, cinco (20%) como “SEC”, duas (7,5%) como “SED” e duas (7,5%) como “SEE”. Foi ressaltada a capacidade de produção de enterotoxinas apresentadas por estas cepas provenientes de animais doentes com mastite bovina, conferindo num possível risco a saúde pública.

Em Goiânia-GO, Nicolau et al. (2001) avaliaram o potencial de produção e tipos de enterotoxinas estafilocócicas encontradas em linhagens de *S. aureus* e extratos de amostras de queijo tipo mussarela. Foram analisadas 218 amostras, das quais 127 (58,2%) apresentaram *S. aureus*. Das amostras positivas para *S. aureus* foram isoladas 419 cepas, sendo que somente 31,5% das cepas isoladas foram submetidas à análise do potencial de produção de enterotoxina. Das cepas analisadas, 13 (9,8%) apresentaram potencial para a produção de enterotoxinas. Destas, oito (61,5%) produziram enterotoxina “SEA”; três (23,1%) “SEB”; uma (7,7%) “SEC” e uma (7,7%) “SEA + SEB”. Segundo os autores, a presença de enterotoxinas estafilocócicas também foi avaliada diretamente em extratos das 76 (34,8%) amostras referidas, onde a presença de enterotoxinas foi detectada em sete (9,8%) das amostras, sendo que destas, cinco (71,5%) apresentaram “SEA” e duas (28,5%) “SEB”.

Rapini et al. (2002) avaliaram 10 amostras de queijo de coalho comercializados em praias do Nordeste. Das dez amostras, foram isoladas 50 cepas de *Staphylococcus*, sendo 46% *S.aureus*, 40% *Staphylococcus* coagulase negativa e 14% *Staphylococcus* sp. Das cepas de *S.aureus*, 21,7% produziram SEC; 39,1% de SEB, e 39,1% de SEB+SEC. Das cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa, 55% produziram SEC, 10% SEB, 20% SEB+SEC e 5% não apresentaram produção de toxinas; enquanto que 85,7% das cepas de *Staphylococcus* sp., produziram SEC e 14,3% SEB. Nenhuma das cepas de *Staphylococcus* sp. apresentaram produção de toxina TSST-1.

Lamaita et al. (2003a) em Minas Gerais, ao detectarem enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC e SED) a partir de cepas de coagulase positiva e negativa isoladas de 80 amostras de leite *in natura* refrigerado de diferentes propriedades, verificaram maior frequência de SEC e SEB, seguido de SED e SEA, sendo o maior percentual de cepas enterotoxigênicas, observado a partir de *Staphylococcus* coagulase negativo. Foi ressaltado que o elevado índice de *Staphylococcus* coagulase negativo é preocupante, uma vez que estes microrganismos não são contemplados pela legislação vigente.

Em Minas Gerais, Lamaita et al. (2003b) detectaram a Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) a partir de cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo isoladas de 80 amostras de leite *in natura* em diferentes propriedades rurais. Foi caracterizada a produção da TSST-1 pela observação individual ou em associação a alguma enterotoxina. Dos “pools” produtores de TSST-1, apenas um “pool” (7,1) produziu esta toxina isoladamente, enquanto que 13 “pools” (92,9%) produziram TSST-1 associada a alguma enterotoxina.

Stamford, Silva e Cunha Neto (2004) pesquisaram em Recife-PE, a ocorrência de cepas de *Staphylococcus* spp. e a sua capacidade de produzir enterotoxinas em leite *in natura*. Foram isoladas 109 cepas de *Staphylococcus* spp. das quais selecionaram 43 que apresentaram reações de termonuclease evidentes, e foram submetidas ao teste imunoenzimático ELISA para a detecção de enterotoxinas. Foi evidenciado que 33 (77%) amostras foram positivas, havendo um predomínio de *S.aureus* e observado que as espécies de *Staphylococcus* analisadas apresentaram positividade para enterotoxinas em percentuais acima de 50%.

Em Belo Horizonte-MG, Lamaita et al. (2004) isolaram espécies de *Staphylococcus* enterotoxigênicas em leite cru coletado de tanques de resfriamento de propriedades leiteiras. Foi observada a produção de enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED e de TSST-1 (Toxina da Síndrome do Choque Tóxico) pelos 138 pools de *Staphylococcus* sp. compostos por *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. sciuri*, *S. cohnii*, *S. hyicus*, *S. scheleiferi*, *S. intermedius* e *S. delphini*, isolados de 80 amostras de leite cru. A SEC foi a mais detectada e a TSST-1 foi produzida por 92,9% dos pools associada a alguma enterotoxina estafilocócica.

Brabes et al. (2004) avaliaram a capacidade de produção de enterotoxinas das cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de ar ambiente, manipuladores e de superfícies de equipamentos de uma indústria de laticínio em Minas Gerais. Foram isoladas 137 cepas, das quais 116 foram identificadas e submetidas à produção, extração e classificação das enterotoxinas. Com relação ao teste de produção e classificação de enterotoxinas, apenas dezessete (14,65%) apresentaram produção de enterotoxinas. Das dezessete produtoras de enterotoxinas, nenhuma pertencia à espécie *S. aureus* e, treze (76,48%) apresentaram produção simultânea de quatro enterotoxinas (SEA, SEB, SEC e

SED). Foi ressaltado que todas as cepas produtoras de enterotoxinas são de espécies coagulase negativa, contrariando aspectos conhecidos de patogenicidade e de legislação.

Em Belo Horizonte-MG, Silva, Siqueira e Dias (2005) analisaram amostras de alimentos (queijos, bolos confeitados, produtos cárneos e refeições prontas) envolvidos em surtos de intoxicação alimentar. Das 55 amostras analisadas, 49,10% apresentaram enterotoxinas estafilocócicas, sendo a SEA a mais freqüente (62,90%) seguida da SEB (51,85) e em 55,55% das amostras, mais de uma toxina foi encontrada.

Normanno et al. (2005) investigaram a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva e *S. aureus* em vários produtos alimentícios fabricados na Itália. Foram analisadas 3097 amostras de leite (leite *in natura* e pasteurizado) e derivados

diferentes animais produziram enterotoxinas SEC ou SED. SEC foi produzida por 4,4% (7/160) dos isolados, SED foi produzida por 7,5% (12/160), e SEC e SED foi produzida por 1,9% (3/160). Nenhum destes isolados testados produziu enterotoxinas SEA ou SEB.

3.6 Surtos de intoxicação alimentar causados por *Staphylococcus* em produtos lácteos

Intoxicação alimentar não é uma doença relatada em muitos países, assim a sua incidência verdadeira é desconhecida. Muitos casos provavelmente são desconhecidos por causa de sua curta duração; somente surtos que envolvem grande números de pessoas (ex. picnics, jantares em grupos, ou instituições públicas) recebem a atenção das autoridades de saúde pública. A incidência da doença em diferentes países varia conforme a geografia e os hábitos alimentares (TRANTER, 1991).

A intoxicação estafilocócica é uma das principais doenças transmitidas por alimentos. No Brasil, a investigação de surtos e casos, com destaque ao rastreamento da origem ou procedência do microrganismo, pode ser considerada ainda recente (PEREIRA et al., 1996 apud PEREIRA et al., 1999a). As enterotoxinas dos tipos A e D, sozinha ou associadas, estão envolvidas com muita frequência em surtos de intoxicação estafilocócica alimentar (ADAMS; MOSS, 1997).

Comumente, os alimentos associados à intoxicação são: carnes e produtos derivados; aves e produtos derivados do ovo; saladas de atum, frango, batata e macarrão; produtos de panificação como pastéis recheados com creme, tortas com creme e bombas de chocolate; recheios de sanduíches; leite cru e

produtos lácteos. Geralmente os produtos que são muito manipulados durante a preparação e posteriormente são armazenados em temperaturas inadequadas (acima de 10°C), estão envolvidos em surtos de intoxicação estafilocócica (OPAS, 2001; FORSYTHE, 2002).

A Coordenação Geral de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde notificou vários surtos de doenças transmitidas por alimentos em várias regiões do Brasil. No Estado do Ceará, em 1999 ocorreram 4 surtos, onde 181 pessoas foram acometidas; em 2000 ocorreram 5 surtos, sendo 81 o número de pessoas acometidas; já em 2001, ocorreram 2 surtos, onde 218 pessoas foram acometidas. No ano de 2002 nenhum surto foi notificado (BRASIL, 2002).

No informe anual de surtos das doenças transmitidas por alimentos, no ano de 2003, o Núcleo de Epidemiologia da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (Tabela 3), notificou 5 surtos de intoxicação alimentar, envolvendo 211 pessoas. Um surto foi atribuído a queijo Minas e queijo de coalho, onde onze pessoas foram acometidas por intoxicação estafilocócica alimentar (BRASIL, 2004).

Tabela 3 Relatos de surtos de doenças transmitidas por alimentos no estado do Ceará em 2003

Nº	Data	Município	Alimento Envolvido	Agente Etiológico	Local de Ocorrência	Enfermos
1	02/01/03	Cascavel	Macarrão c/ carne	<i>Salmonella ssp.</i>	Restaurante	103
2	06/02/03	Aquiraz	-	-	Escola	27
3	29/04/03	Fortaleza	Queijo Minas e queijo de coalho	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	Hotel	11
4	09/07/03	Camocim	-	Peixe baiacu	Domicílio	02
5	20/11/03	Fortaleza	-	Salada de verduras c/ atum	Hotel	68
					Total	211

Fonte: BRASIL, 2004.

Segundo registros do Sistema de Informação para a Vigilância das Doenças Transmissíveis por Alimentos na América Latina e Caribe (SIRVETA 2005), durante o período de 1998 a 2002, ocorreram 13 surtos de intoxicação estafilocócica causadas por queijos no Brasil envolvendo 72 enfermos (Tabela 4). Destes surtos, dois foram notificados no Estado do Ceará no ano de 2000, envolvendo queijo, com quatorze pessoas enfermas, sete em cada surto. Em Cuba, México, Nicarágua, Uruguai e Venezuela, a presença de estafilococos produtores de enterotoxinas em queijos, foi responsável por 1949 enfermos (Tabela 4).

Tabela 4 Relatos de surtos de intoxicação estafilocócica envolvendo produtos lácteos no período de 1998 a 2002.

País	Alimento	Agente Etiológico	Enfermos (nº)
Argentina	Leite pasteurizado	<i>S. aureus</i>	98
Bolívia	Produtos lácteos	<i>Staphylococcus</i> sp.	1195
Brasil	Leite	<i>S. aureus</i>	07
	Queijo	<i>S. aureus</i>	58
	Queijo colonial	<i>S. aureus</i>	14
Cuba	Arroz com leite	<i>S. aureus</i>	12
	Creme	<i>S. aureus</i>	37
	Mistura de sorvete	<i>S. aureus</i>	120
	Produtos lácteos	<i>S. aureus</i>	85
	Leite	<i>S. aureus</i>	11
	Doce de chocolate	<i>S. aureus</i>	151
	Queijo	<i>S. aureus</i>	83
	Queijo branco	<i>S. aureus</i>	113
	Queijo “criollo”	<i>S. aureus</i>	44
	Queijo fresco	<i>S. aureus</i>	08
Queijo com doce de goiaba	<i>S. aureus</i>	12	
México	Queijo Fresco	<i>S. aureus</i>	06
Nicarágua	Coalhada, creme	<i>S. aureus</i>	129
	Queijo	<i>Staphylococcus</i> sp.	51
Panamá	Arroz com leite	<i>Staphylococcus</i> sp.	10
República Dominicana	Leite	<i>S. aureus</i>	916
Uruguai	Queijo	<i>S. aureus</i>	38
	Queijo artesanal	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	08
Venezuela	Leite	<i>Staphylococcus</i> sp.	78
	Queijo	<i>Staphylococcus</i> sp.	688
	Queijo branco	<i>Staphylococcus</i> sp.	269
	Queijo “Llanero”	<i>Staphylococcus</i> sp.	06
Total			4247

Fonte: SIRVETA, 2005.

Sabioni, Nascimento e Pereira (1994) avaliaram a ocorrência de surto de intoxicação estafilocócica causada por queijo “Minas” em Ouro Preto-MG, em janeiro de 1992. Neste surto, o número de casos relatados foi onze, com três pessoas hospitalizadas. A contagem de *S. aureus* foi de $7,0 \times 10^5$ a $2,1 \times 10^8$ UFC/g, onde 93,75% das culturas de *S.aureus* que foram testadas eram produtoras de enterotoxinas SEA, SEB ou SED. O queijo envolvido no surto havia sido produzido com leite cru e comercializado pelo próprio fabricante, sem qualquer refrigeração.

Carmo et al. (2002) relataram que no ano de 1999 em Manhaçu e Passa-quatro-MG foram notificados dois surtos de intoxicação estafilocócica envolvendo um total de 378 indivíduos no primeiro surto, dos quais, 50 indivíduos ficaram doentes depois de consumir queijo Minas. Os sintomas de intoxicação alimentar (diarréia, vômito, vertigens, frios e dores de cabeça) apareceram dentro de 2 horas nos indivíduos que ingeriram o queijo. No segundo surto, 328 indivíduos foram afetados e apresentaram sintomas de diarréia e vômito após o consumo de leite cru. No primeiro surto as análises do queijo Minas e do leite não pasteurizado mostraram que o *S. aureus* estava presente na faixa de $2,4 \times 10^3$ a $2,0 \times 10^8$ UFC/g e tinha produzido as enterotoxinas SEA, SEB e SEC. No segundo surto, a análise do leite cru indicou a presença de *Staphylococcus* coagulase negativa em contagens excedendo $2,0 \times 10^8$ UFC/g e a produção de enterotoxinas SEC e SED. As enterotoxinas específicas encontradas em cada um dos dois surtos, envolveram como fonte de contaminação, no primeiro surto, os manipuladores de alimentos e para o segundo, a mastite no gado leiteiro.

Vários surtos de intoxicação alimentar foram relatados pela FUNED/IOM no período de 1997 a 2002 no Estado de Minas Gerais envolvendo o consumo de leite (leite cru e leite UAT) e produtos derivados (queijo canastra, queijo curado,

queijo Minas, queijo mussarela, queijo ralado, bebida láctea e requeijão). Os alimentos suspeitos foram encaminhados pela Vigilância Sanitária Estadual e/ou Municipal, para o laboratório de Microbiologia de Alimentos e Laboratório de Enterotoxinas da FUNED/IOM onde pesquisaram *Staphylococcus* sp. e produção de enterotoxinas. As contagens de *Staphylococcus* sp. nos produtos incriminados variaram de $6,0 \times 10^3$ a $1,8 \times 10^8$ UFC/g, e as principais enterotoxinas estafilocócicas envolvidas nos surtos foram SEA, SEB e SEC (VERAS et al., 2003).

Em Minas Gerais, no período de 1995 a março de 2001, diversos tipos de queijos foram responsáveis por 23 surtos de intoxicações alimentares por enterotoxinas estafilocócicas, com 660 enfermos e um óbito (CARMO, 2002).

A intoxicação estafilocócica evolui rápida e progressivamente e pode ser fatal. Segundo relatos da Fundação Ezequiel Dias – FUNED, nos últimos cinco anos, 12.820 pessoas foram intoxicadas e 17 morreram em Minas Gerais, depois de ingerir alimentos contaminados por enterotoxina estafilocócica produzida por *S. aureus* (CARMO, 2002).

Silva et al. (2003) relataram que no período de janeiro de 2000 a julho de 2003 foram notificados e encaminhados ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do IOM/FUNED, 309 alimentos suspeitos de causarem 138 surtos de doenças transmitidas por alimentos, envolvendo 2715 pessoas. Foram encontrados *Staphylococcus* sp. capazes de produzirem toxinas em 39,1% das amostras analisadas.

Segundo Le Loir, Baron e Gautier (2003), na França, durante o período de dois anos, de 1999 a 2000, os produtos lácteos e especialmente os queijos foram responsáveis por 32% dos casos de intoxicação alimentar.

3.7 Métodos analíticos na detecção das enterotoxinas estafilocócicas

Os primeiros métodos para o ensaio de toxinas bacterianas foram baseados em testes *in vivo* (animal) ou *in vitro* (cultura de tecido). Posteriormente, testes imunológicos foram desenvolvidos baseados em técnicas semelhantes, com difusão em gel, mas estes testes foram considerados laboriosos e difíceis para aplicação em alimentos. Os primeiros animais utilizados para o diagnóstico de enterotoxinas estafilocócicas foram, gatos (filhotes e adultos) administrados por via intraperitoneal ou intravenosa, e macaco Rhesus (*Macaca mullata*), administrados por via oral, entre outros (PIMBLEY; PATEL, 1998).

O teste de reação emética em macacos permanece até o presente momento como metodologia comprobatória para enterotoxinas desconhecidas e não caracterizadas, considerando-se como enterotoxinas estafilocócicas todas as substâncias que, uma vez administradas intragastricamente, determinam reação emética nestes animais (SURGALLA et al., 1953 apud PEREIRA et al., 1999b). As dificuldades referentes ao emprego de macacos estão relacionadas com custos de manutenção e, principalmente, com a perda de sensibilidade decorrente do desenvolvimento de anticorpos específicos após sucessivas administrações (MINOR; MARTH, 1972 apud PEREIRA et al., 1999b).

A ingestão de 100 a 200 ng de enterotoxina pode induzir sintomas de intoxicação alimentar, e alimentos envolvidos em intoxicações tipicamente estafilocócicas apresentaram cerca de 0.5 – 10 µg de toxina por 100g. Assim, a sensibilidade de qualquer método de detecção de toxinas precisa ser abaixo desse nível, preferencialmente na faixa 0.1 – 0.2 µg por 100g (EVENSON et al., 1998 apud PIMBLEY; PATEL, 1998).

3.7.1 Métodos imunológicos tradicionais

Ensaio imunológico são muito mais simples e mais baratos que ensaios biológicos e, portanto tem sido extremamente adotados. Estes testes fundamentam-se na capacidade do antígeno (enterotoxina) interagir com anticorpos policlonais específicos e de título próprio, permitindo a formação de um precipitado denominado precipitina. A união do antígeno-anticorpo, incorporados em uma placa de ágar ou agarose, determinará o aparecimento do precipitado, que se mostra como uma banda ou linha branca, de fácil leitura e observação, sendo que a distância percorrida por esta união é diretamente proporcional à quantidade de antígeno presente na amostra teste. Quando os dois componentes são dispostos, separadamente, no suporte de ágar ou agarose e se ambos se difundem um em direção ao outro, a técnica é denominada imunodifusão dupla. Por outro lado, quando só o antígeno se movimenta em direção ao anticorpo fixo, o método é denominado imunodifusão simples (BERGDOLL, 1990 apud PEREIRA et al., 1999b).

O procedimento imunológico denominado “micro-slide gel double diffusion test” (micro imunodifusão em lâmina), no qual pequenas quantidades e reagentes utilizados conferem sensibilidade e velocidade à reação, apresenta nível de detecção que se estende até $0,1 \mu\text{g/mL}$. Esta técnica permite evidenciar a presença de enterotoxinas estafilocócicas diretamente da amostra testada; entretanto, apresenta as desvantagens de exigir uma prévia separação dos constituintes solúveis e insolúveis e, finalmente cuidadosa concentração da amostra. Isto aumenta muito o tempo de análise e requer pessoal especialmente capacitado para a execução (ANDERSON, 1989).

A metodologia denominada “Optimum Sensitivity Plate - OSP” (Sensibilidade Ótima em Placa), proposta por Robbins et al. (1974) citado por Anderson (1989), foi considerada adequadamente sensível para a avaliação de linhagens enterotoxigênicas. Com este método se detectam entre 0,5-1,0 μ g de enterotoxina/mL, tem menor sensibilidade que a técnica de micro imunodifusão em lâmina, sendo mais fácil de execução e leitura.

3.7.2 Métodos imunológicos mais sensíveis

Considerando que um número significativo de linhagens enterotoxigênicas produzem enterotoxinas em pequena quantidade, muitas vezes inferior a 1ng/mL, as enterotoxinas não seriam, portanto, detectadas pelos métodos de imunodifusão citados anteriormente, e mesmo assim, seriam capazes de causar intoxicação alimentar (IGARASHI et al.,1986; KOKAN; BERGDOLL, 1987; EVENSON et al., 1988 apud PEREIRA et al., 1999b).

Assim, procedimentos que possam ser aplicados aos extratos de alimentos, permitindo níveis de detecção abaixo de 1 μ g/mL (próximo a 0,1-1,5 ng/mL) e portanto, de maior acuidade que o método de imunodifusão em lâmina, vem caracterizando o perfil de métodos de maior abrangência que são compatíveis com as linhagens produtoras de enterotoxinas estafilocócicas em quantidades muito pequenas, permitindo ao mesmo tempo, entre outras vantagens, resultados em tempo mais rápido. Entre os métodos imunológicos mais sensíveis para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em fluidos sobrenadante de cultura e extratos de alimentos, destacam-se atualmente, o método por aglutinação Reversa Passiva em Látex (Reversed passive latex agglutination, RPLA) e ELISA - Enzyme Linked

Immunosorbent Assay. Outro método também sensível é o Radioimunoensaio (Radioimunoassay-RIA), porém há um grande inconveniente pelo fato de utilizar material radioativo, representando riscos para o técnico e para o meio ambiente. Com o advento do ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), as desvantagens apresentadas pelo RIA foram sanadas, pois o ELISA é um método de execução simples, apresenta resultados rápidos e sensíveis, além de não utilizar material radioativo (PEREIRA et al., 1999b).

Atualmente, existem seis kits de métodos rápidos disponíveis para detecção de enterotoxinas estafilocócicas, são eles: SET-RPLA (Oxoid); BOMMELI SET-EIA (Dr. Bommeli AG); TECRA SET-VIA (Bio-Enterprises Pty Ltd); RIDASCREEN SET (R-Biopharm GmbH); TRANSIA (Transia Dffchamb - SA) e o VIDAS – SET (bioMérieux) (BRETT,1998). Na Tabela 5 são apresentadas algumas das técnicas para a detecção de toxinas bacterianas relatadas na literatura e em fontes comerciais de kits baseados nestas técnicas (PIMBLEY; PATEL, 1998).

Tabela 5 Métodos imunológicos para toxinas bacterianas

Organismo	Toxina	Ensaio Método	Kit Comercial Fornecedor
<i>S. aureus</i>	A – D	Aglutinação passiva reversa em látex	SET-RPLA (Oxoid)
	A – E	ELISA	BOMMELI SET-EIA (Dr Bommeli AG)
	A – E	ELISA	TECRA SET-VIA (BioEnterprises Pty Ltd)
	A – E	ELISA	RIDASCREEN SET (R-Biopharm GmbH)
	A – E	Imunoensaio	TRANSIA (Transia Dffchamb-SA)
	A – E	ELISA Automatizado	VIDAS-SET (bioMérieux)

Fonte: PIMBLEY; PATEL, 1998 (Tabela 2 Modificada).

O kit SET-RPLA (Oxoid) é um teste imunológico que utiliza partículas de látex para a detecção simultânea de enterotoxinas estafilocócicas A, B, C e D em extratos de alimentos e culturas filtradas. Haines e Stannard (1987) apud Pimbley e

Patel (1998) relataram reações não específicas com este kit, para alguns alimentos, por ex. queijo e pitu. Essas reações não específicas podem ser reduzidas pela adição de 10nm/L de hexametáfosfato para o diluente (ROSE et al., 1989 apud PIMBLEY; PATEL, 1998).

O teste BOMMELI SET-EIA é um ELISA fase sólida que usa bordas cobertas de poliestireno juntas com anticorpos das enterotoxinas estafilocócicas de A – D. O TECRA SET-VIA Staphylococcal Enterotoxin Visual Immunoassay (Bio Enterprises Pty Ltd, Roseville, Austrália) é uma microtitulação rápida para detectar enterotoxinas estafilocócicas de A – E em concentrações abaixo de 1ng/mL em alimentos e culturas filtradas. Os resultados podem ser lidos visualmente com um cartão colorido ou por medida da absorbância em 414 nm numa placa leitora. O tempo para análise é tipicamente 3,6 – 4h para a maioria das amostras, entretanto para alimentos termicamente processados, 21h são requeridas, devido ao tratamento específico com uréia para renaturar a enterotoxina (PARKER et al., 1993 apud PIMBLEY; PATEL, 1998).

O RIDASCREEN™ SET (R – Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany) é um método ELISA sanduíche, para análise qualitativa de enterotoxinas estafilocócicas de A – E, que usa anticorpos monovalentes. Na avaliação, o kit foi altamente específico, sensível (0,2 – 0,25 ng/ml) para uma série de tipos de alimentos contaminados artificialmente, e relativamente simples para realizar, requerendo menos que 3h para completar o teste (PARKER et al., 1996 apud PIMBLEY; PATEL, 1998).

O TRANSIA imunoensaio para enterotoxinas estafilocócicas de A – E, é um ensaio sanduíche baseado numa mistura de anticorpos monoclonais e policlonais em tubo. Os resultados são determinados visualmente por comparação

com um controle positivo ou fotometricamente a 450 nm (LAPEYRE et al., 1996 apud PIMBLEY; PATEL, 1998).

O ensaio VIDAS[®] Staphylococcal Enterotoxin (SET) (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) é um imunoenensaio enzima ligada fluorescente (ELFA enzyme-linked fluorescent immunoassay), para a detecção simultânea de enterotoxinas estafilocócicas A, B, C₁, C₂, C₃, D, e E em alimentos. O VIDAS[®] tem boa sensibilidade para enterotoxinas A, B, D e E, mas é menos sensível para as enterotoxinas C com alimentos contaminados artificialmente. A sensibilidade de detecção alcançada foi de \square 1ng/mL a 1,5 ng/mL, dependendo da toxina e do alimento (LAPEYRE et al., 1996 apud PIMBLEY; PATEL, 1998).

O sistema VIDAS[®] alia a moderna automatização de diferentes testes unitários executados simultaneamente com a metodologia ELFA (Enzyme Linked Fluorescente Assay) (Figura 1). Este ensaio imunológico é similar ao ELISA, apresentando como diferença o substrato 4 MUP (4 Metil Umbeliferil Fosfato) que após ser hidrolizado pela enzima fosfatase alcalina, se transforma em umbeliferona, emitindo fluorescência a 450nm, quando excitada a 370nm. A intensidade de fluorescência liberada é medida, e determina o resultado. Os testes tornam-se, portanto mais sensíveis, uma vez que a mínima formação do hidrolizado produz sinais de fluorescência detectáveis. A maior especificidade do teste ELFA é dada em função do tipo de reação realizada (sanduíche indireto, sanduíche direto, competição e imunocaptura), dependendo da pesquisa realizada. A utilização do sistema depende exclusivamente do equipamento e reagentes. O equipamento mini VIDAS[®] é responsável pela realização de todas as etapas da reação até a leitura final (pipetagem, lavagens e leitura). Apresenta-se dividido em dois compartimentos independentes, onde cada um possui 6 canais que possibilitam a execução

simultânea de 6 testes, sendo de 12 testes a capacidade total de execução simultânea. As câmaras de reação são compostas por ponteiros cônicos, nas quais estão adsorvidos o anticorpo de captura e um cartucho composto por nove compartimentos, nos quais estão presentes os demais reagentes utilizados na reação (tampão de lavagem, conjugado e substrato). Para proceder à análise, a amostra é colocada no primeiro compartimento do cartucho, a ponteira imerge automaticamente na amostra sendo aspirada e refluída várias vezes, permitindo que ocorra a reação entre o antígeno solúvel na amostra e o anticorpo adsorvido na ponteira. O cartucho desloca-se horizontalmente para a próxima etapa, que corresponde ao descarte da amostra, onde foram capturados os antígenos, mecanicamente o cartucho desloca-se e o conjugado é aspirado pela ponteira, realizando os mesmos movimentos de aspiração e refluxo, e o procedimento segue o mesmo mecanismo até a última etapa onde o substrato será hidrolisado. Quanto a revelação da reação, o 4 MUP, na presença da enzima fosfatase alcalina, sofre hidrólise e transforma-se em umbeliferona. O produto final é devolvido a cúpula de leitura, sofrendo excitação a 370nm, emitindo uma fluorescência a 450nm, cuja intensidade é captada por um sensor. O RFV (Valor Relativo de Fluorescência) é calculado e convertido pelo computador em resultado final do teste. O resultado do teste corresponde ao valor do sobrenadante dividido pelo valor de fluorescência relativo padrão ou RFV. Qualquer resultado com leitura $\leq 0,13$ é considerado negativo (OLIVEIRA, 1999).

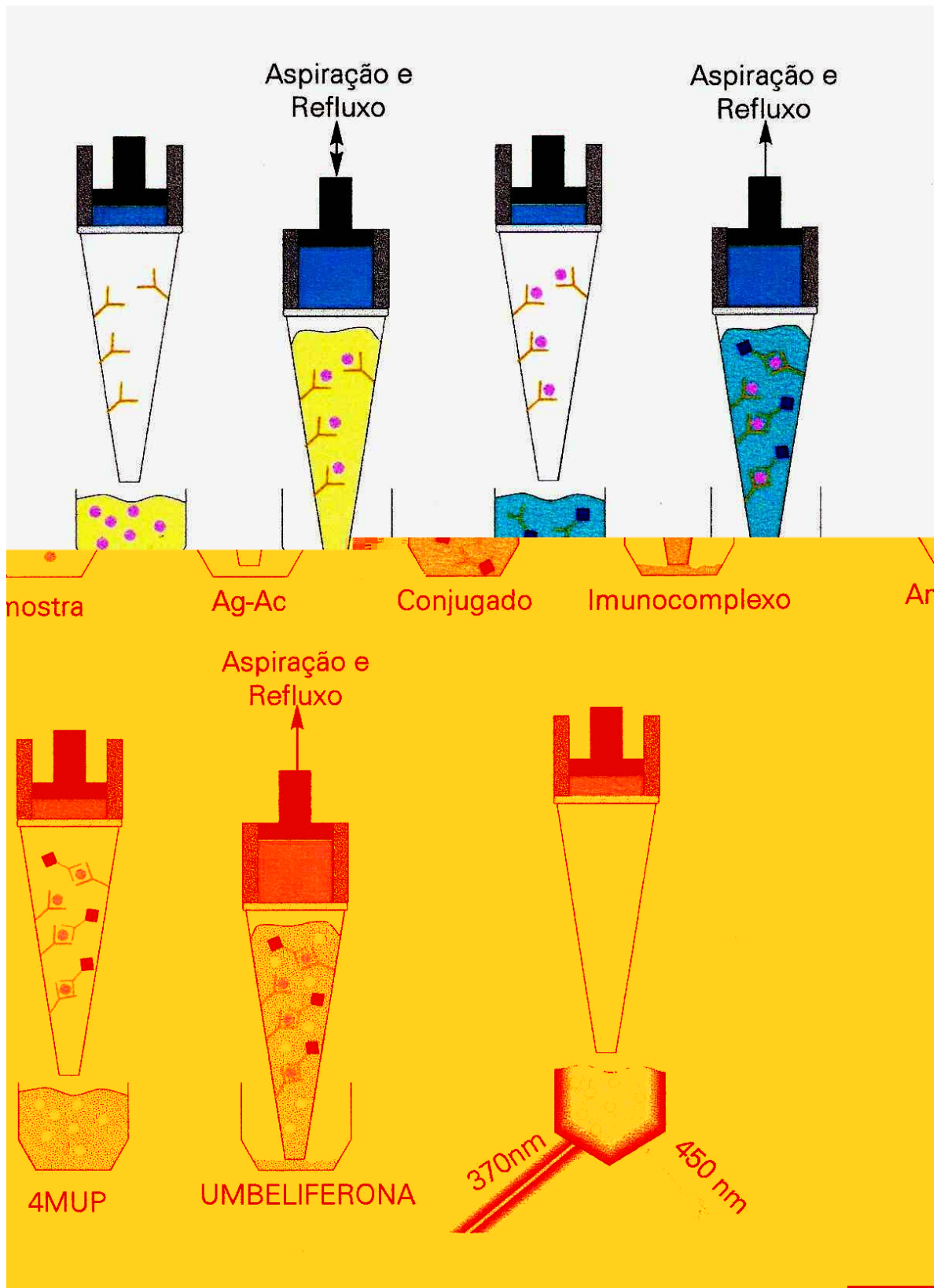


Figura 1 Representação esquemática do método ELFA no sistema mini VIDAS®

Na Tabela 6 estão demonstradas detalhadamente as eficiências dos kits comerciais para detecção de enterotoxinas de *S.aureus*.

Tabela 6 Kits para detecção de enterotoxinas de *S.aureus*

	BOMMELI	RIDASCREEN	TECRA	TRANSIA	RPLA-SET	VIDAS
Toxinas detectadas	A-D (H*)	A-E	A-E	A-E	A-D (E#)	A-E
Toxinas diferenciadas	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Sensibilidade	Alta	Alta	Média	Média	Baixa	Média
Especificidade	Alta	Alta	Baixa	Baixa	Alta	Média
Controles	-, IgG	+, -, IgG	+, -	+, -	+, -, IgG	+, -
Tamanho da amostra	□ 20 mL	0,7 mL	0,2 mL	0,5 mL	0,2 mL	0,5 mL
Duração do teste	24h	3h	4,5h	1,5-2h	16h	1,5h
Duração da extração	4-8h	2h	0,5-24h	2h	0,5h	0,5-2h
Complexidade do teste	Alta	Média	Média	Média	Baixa	Automatizado
Complexidade da extração	Alta	Média	Média/Alta	Média	Baixa	Baixa
Resultados subjetivos	Não	Não	Sim ou			

um teste qualitativo automatizado no sistema VIDAS, que permite a detecção das enterotoxinas estafilocócicas nos produtos alimentares pela técnicas ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

No kit VIDAS® Staph Enterotoxin II (SET 2), anticorpos monoclonais complementares e anticorpos policlonais dirigidos para diferentes sítios antigênicos de enterotoxinas A, B, C, D e E são usados para otimizar a captura e detecção. O tratamento que remove o fragmento Fc aderido ao anticorpo enzima conjugada, aumenta significativamente a performance do kit. A remoção do fragmento Fc reduz possível interferência com matrizes do alimento e outra bactéria que tenha o potencial de gerar falsos sinais. Isto resulta em melhor especificidade. A liberação de dois pequenos fragmentos Fab' otimiza o posicionamento do anticorpo e favorece o reconhecimento do antígeno, o que resulta em melhor sensibilidade (bioMérieux, 2003).

Wienke (1991) citado por Pimbley e Patel (1998) comparou quatro kits para testes imunológicos para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos e concluiu que nenhum método foi superior, embora o SET-RPLA seja mais barato e fácil para realizar. O kit BOMMELI SET-EIA foi comparado com outros três kits comerciais, sendo o mais sensível para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar. O kit BOMMELI SET-EIA detectou enterotoxinas em 14 de 18 alimentos, comparados com 9 para o teste RPLA e 10 para o TRANSIA ELISA, tendo o maior tempo de teste (24h).

Técnicas baseadas em pesquisa com ácidos nucléicos e amplificação PCR tem sido descritas, mas estas não estão comercialmente disponíveis (WILSON et al., 1991; JAULHAC et al., 1991; apud PIMBLEY; PATEL, 1998).

Vernozy-Rozand et al. (2004) compararam três métodos imunológicos comercialmente disponíveis para a detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos, dos quais dois sistemas de detecção automática: VIDAS[®] SET (bioMérieux), VIDAS[®] Staph enterotoxin (SET2) (bioMérieux); e um método ELISA, TRANSIA Staphylococcal Enterotoxins (Diffchamb-AS). Diferentes quantidades de enterotoxinas estafilocócicas purificadas (A, B, C₂, D e E) foram adicionadas aos alimentos. Foi evidenciado que a nova geração de kit do sistema VIDAS[®] Staph enterotoxin (SET2) obteve uma melhor especificidade (100%) e sensibilidade que o sistema VIDAS[®] SET (96%) e o TRANSIA Staphylococcal Enterotoxins (100%), em produtos lácteos. Ressaltaram mais precisamente que o VIDAS[®] SET2, pôde detectar □ 0.5ng/g de toxinas A e B, □ 1 ng/g de toxinas C₂ e E, e 1 ng/g de toxinas D e E.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 80 amostras diferentes de várias marcas (23) de queijo de coalho, sendo 33 amostras (12 marcas) de queijos de coalho artesanais do Ceará, 11 amostras (2 marcas) de queijos de coalho artesanais de outros estados, 13 amostras (2 marcas) de queijos de coalho industrial sob registro do Serviço de Inspeção Estadual (SIE) e 23 amostras de (7 marcas) de queijos de coalho industrial sob Serviço de Inspeção Federal (SIF).

As análises foram realizadas segundo a metodologia recomendada pelo “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” (LANCETTE; BENETT, 2001), exceto para o teste de Dnase que foi determinado segundo Anderson (1989).

4.1 Coleta e transporte das amostras

As amostras das 23 marcas diferentes de queijo de coalho foram coletadas mensalmente, sendo coletada mais de uma vez a mesma marca, durante sete meses nos pontos de venda (mercado, mercadinho, padarias e supermercados), na cidade de Fortaleza-Ceará no período de março a outubro de 2004. Quando a marca coletada não estava disponível nos pontos de comercialização, outra marca de queijo de coalho era adquirida para análise. Estas amostras foram transportadas em caixas isotérmicas ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará para o Laboratório de Microbiologia de alimentos onde foram realizadas as pesquisas para *Staphylococcus* sp. e *Staphylococcus* coagulase positiva.

4.2 Preparo das amostras e diluições

Foram utilizadas unidades analíticas de 25g de cada amostra, retirada assepticamente e transferida para frascos contendo 225mL de solução salina peptonada como diluente. Em seguida as amostras foram homogeneizadas por 60 segundos e submetidas às diluições subseqüentes até 10^{-6} .

4.3 Isolamento

De cada uma das diluições das amostras de queijos examinadas, foram transferidas uma alíquota de 0,3 mL; 0,3 mL e 0,4 mL para a superfície de três placas de Ágar Baird-Parker, previamente preparadas e secas. Em seguida, o

inóculo foi espalhado por toda a superfície do meio, com o auxílio de alça de Drigalsky, até todo o inóculo ter sido absorvido. Após secarem completamente, as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 48 horas. Após a incubação, foi efetuada a contagem do número de colônias presuntivas. Selecionou-se placas com contagens entre 20 e 200 colônias e contadas as colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus* sp. Os números de colônias contados foram multiplicados pelo valor da diluição correspondente as placas de contagens, obtendo-se assim o valor da contagem presuntiva de *Staphylococcus* sp. por grama de queijo analisado.

4.4 Identificação

Foram selecionadas cinco colônias típicas (colônias circulares, pretas, pequenas no máximo 1,5mm em diâmetro, lisas, convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçadas nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente se estendendo para além da zona opaca) e/ou atípicas (colônias cinzentas, sem um ou ambos os halos típicos) de *Staphylococcus*.

4.4.1 Crescimento em ágar inclinado

Cada colônia selecionada em ágar Baird-Parker foi inoculada por estria em um tubo com ágar peptona de caseína de farinha de soja (TSA) inclinado e incubado a 35°C por 24 horas.

4.4.2 Coloração de Gram

A partir da cultura em TSA inclinado, foi preparado um esfregaço para coloração de Gram e observada ao microscópio a presença de bactérias do gênero *Staphylococcus*, ou seja, na forma de cocos gram positivos.

4.4.3 Teste de coagulase

A partir do ágar TSA; cada uma das cinco colônias de *Staphylococcus* sp. foram transferidas para caldo infusão cérebro coração (BHI) e incubadas a 35°C por 24 horas. Após crescimento, foram transferidos 0,2 mL da cultura obtida em BHI, para um tubo de 10x100mm, em seguida foram adicionados 0,5 mL de Coagulase Plasma-EDTA (plasma de coelho com EDTA) e misturadas com movimentos de rotação, sem agitar os tubos, para não interferir na coagulação. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C e observados a cada uma hora, se houve formação de coágulo. Formação de coágulo 3□ ou 4□ (Figura 2) foram consideradas reações positivas para *Staphylococcus* coagulase positiva (LANCETTE; BENETT, 2001).

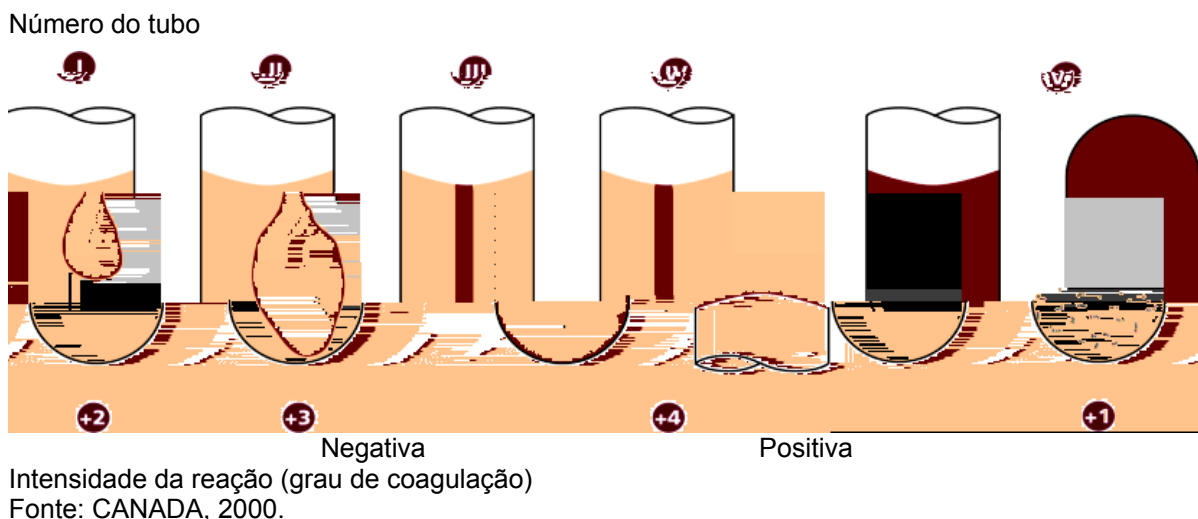


Figura 2 – Reação do teste de coagulase para cepas de *Staphylococcus* sp.

4.4.4 Teste de Dnase

Cada uma das cepas isoladas em TSA foram inoculadas em ágar Dnase e incubadas a 35°C por 24 horas. Após o crescimento das colônias, foram vertidos sobre cada uma, algumas gotas de solução de HCl 5 mol/L. Após alguns minutos, observou-se se houve a reação, que consiste na aparição de um halo transparente ao redor das mesmas, o que indica que o microrganismo liberou Dnase. Foi inoculada também em ágar Dnase, uma cepa padrão de *S. aureus* ATCC 12600 para controle positivo e uma cepa padrão de *S. epidermidis* ATCC 12228 para controle negativo.

4.4.5 Teste de catalase

Foi realizado a partir da cultura de TSA em placa, onde foi adicionado 1,0 mL da solução de peróxido de hidrogênio 3% (v/v) à cultura, e observado se ocorreu

borbulhamento imediato (teste positivo) ou não (teste negativo) (LANCETTE; BENETT, 2001).

4.5 Cálculo dos resultados

Foram consideradas como estafilococos coagulase positiva, todas as culturas com reação de coagulase de níveis 3□ e 4□. O cálculo do número de UFC/g foi feito em função do número de colônias típicas contadas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas (LANCETTE; BENETT, 2001).

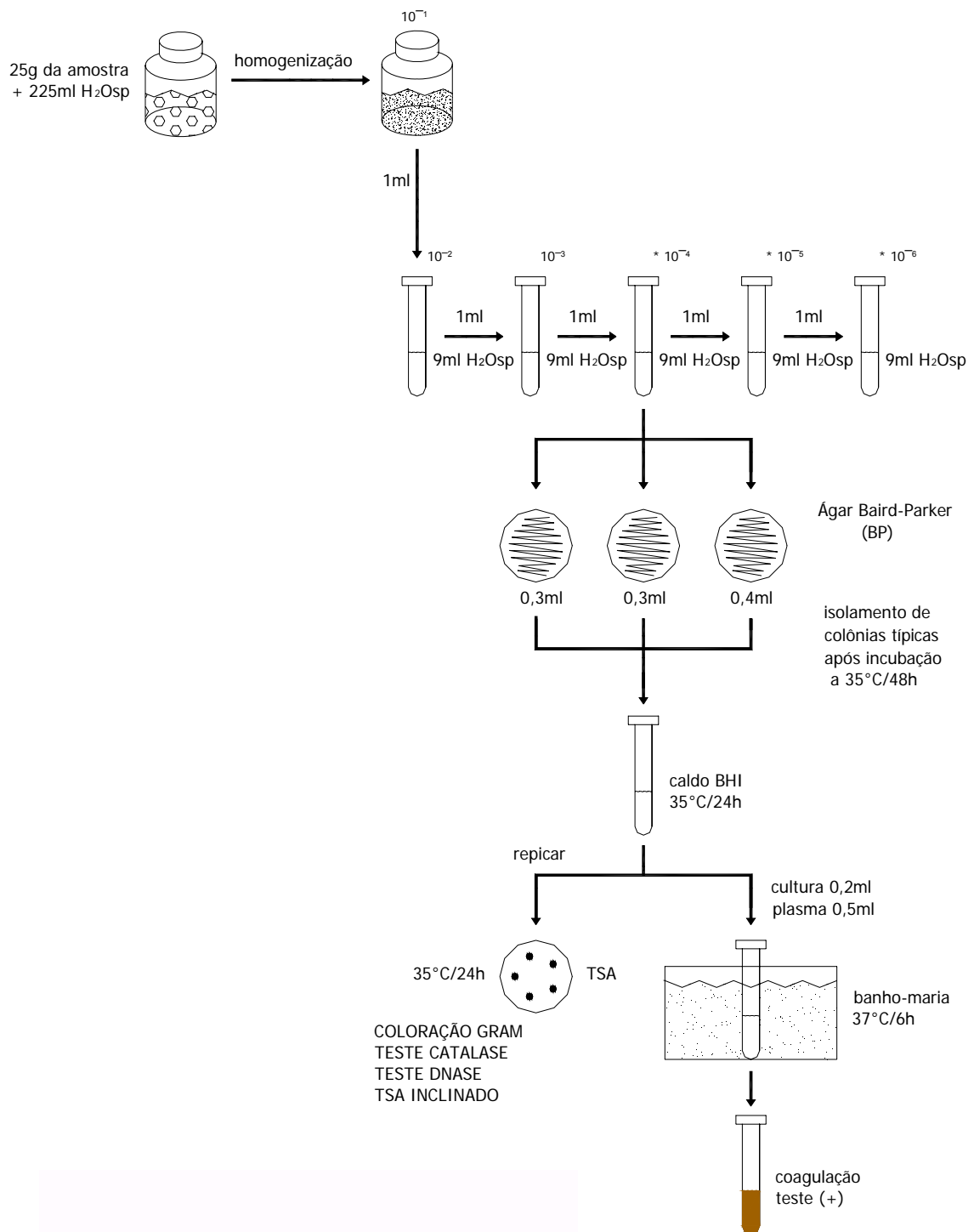


Figura 3 – Representação esquemática da metodologia de preparação da amostra e diluições, isolamento e identificação das cepas de *Staphylococcus* sp. para amostras de queijos.

4.6 Detecção de enterotoxinas em queijo de coalho artesanais e industriais

Este ensaio foi realizado em 43 amostras de queijos de coalho artesanais e industriais contaminados com *Staphylococcus* coagulase positiva. As amostras de queijos analisadas, foram preparadas de acordo com o protocolo de preparação das amostras do método VIDAS® Staph enterotoxin II (SET2) da bioMérieux® para produtos lácteos.

4.6.1 Preparo das amostras de queijos de coalho artesanais e industriais para obtenção dos extratos para análises de enterotoxinas

Para a obtenção dos extratos para as análises de enterotoxinas estafilocócicas, as amostras de queijos de coalho foram trituradas e homogeneizadas. Em seguida foram pesados 25 gramas das amostras de queijos de coalho, homogeneizadas e adicionadas 40mL de água destilada pré-aquecida a 38°C. Após essa etapa, procedeu-se à mistura para obter uma suspensão homogênea, deixando-as em repouso durante 30 minutos a 18°C. Antes de serem centrifugadas, o pH da suspensão foi ajustado entre 3,5 e 4,0 com HCl 5 mol/L. Após o ajuste de pH, as suspensões foram centrifugadas a 10.000 rpm, a temperatura de 18°C durante 15 minutos. Após a 1ª centrifugação o sobrenadante foi recuperado, sendo feito o ajuste do pH entre 7,5 e 8,0 com NaOH 1 mol/L. Em seguida, uma outra centrifugação do extrato foi realizada a 10.000 rpm e a temperatura de 18°C durante 15 minutos. Após a 2ª centrifugação, os extratos foram transferidos para frascos com tampas e congelados. Os extratos congelados das amostras de queijos

foram enviados ao Laboratório de Toxinas Microbianas da Universidade de Campinas - UNICAMP, São Paulo, para realização do teste de enterotoxinas.

No Laboratório de Toxinas Microbianas da UNICAMP, após o descongelamento dos extratos, foram pipetados 500 µL e cada alíquota do extrato foi transferida para uma cuvete VIDAS[®] Staph enterotoxin II (SET2) para efetuar o teste. O barrete VIDAS[®] foi introduzido no equipamento mini VIDAS[®]. O aparelho foi acionado para a realização automática de todas as etapas do teste com duração de 80 minutos.

4.7 Detecção de produção de enterotoxinas em cepas de estafilococos coagulase positivas isoladas de queijos de coalho artesanais e industriais

Foram isoladas 132 cepas de estafilococos coagulase positiva a partir das 43 amostras de queijos de coalho contaminadas com estafilococos coagulase positiva.

4.7.1 Preparo das cepas de estafilococos coagulase positivas isoladas de queijos de coalho artesanais e industriais, para obtenção dos extratos para as análises de enterotoxinas

A partir das 132 cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas, foram selecionadas 57 cepas para formação dos doze “pools”. Cada “pool” continha 5 cepas de *Staphylococcus* que apresentaram positividade ao teste de coagulase e Dnase, isoladas da mesma amostra de queijo de coalho. Os 12 “pools” de cepas foram reativados em 3mL de caldo infusão cérebro coração (BHI) enriquecido com

1% de extrato de levedura e incubados em estufa a 35°C por 24h. Essas cepas foram ativadas duas vezes. Após a segunda ativação, retirou-se uma alíquota de 2mL da cultura e transferiu-se novamente para 3mL de caldo infusão cérebro coração (BHI) enriquecido com 1% de extrato de levedura e submeteu-se à incubação em estufa a 37°C por 18h sob agitação a 150 rpm. Após a incubação dos doze “pools” de cepas sob agitação, retirou-se uma alíquota de 2mL de cada inóculo e corrigiu-se o pH antes da centrifugação.

Para correção do pH de cada cultura, foram adicionadas algumas gotas de HCl 5 mol/L até que o pH se ajustasse entre 3,5 e 4,0. O valor do pH foi verificado com fita indicadora Merck. Após o ajuste do pH, as suspensões das culturas foram levadas à centrifugação a 10.000 rpm a uma temperatura de 18°C durante 15 minutos. Em seguida, recuperou-se o sobrenadante dos 12 pools e ajustou-se o pH com solução de NaOH 1 mol/L até que o pH se ajustasse entre 7,5 e 8,0. O valor do pH foi novamente verificado com fita indicadora Merck. Após o ajuste do pH, os extratos das culturas foram levados novamente à centrifugação a 10.000 rpm a uma temperatura de 18°C durante 15 minutos. Os extratos obtidos na 2ª centrifugação foram transferidos para frascos com tampas e congelados. Em seguida foram enviados ao Laboratório de Toxinas Microbianas da Universidade de Campinas, São Paulo (UNICAMP) para realização do teste no aparelho Mini VIDAS® conforme descrito no item 4.3.1.

4.8 Resultados e interpretação do teste de detecção de enterotoxinas estafilocócicas no aparelho mini VIDAS®

Terminado o teste (após 80 minutos) os resultados foram analisados automaticamente. O aparelho efetua duas medidas de fluorescência na cuvete de leitura para cada teste. A primeira leitura corresponde ao branco da cuvete antes do substrato entrar em contato com o cone. A segunda leitura é efetuada após incubação do substrato com a enzima presente no cone. O cálculo do RFV (Relative Fluorescence Value) é o resultado da diferença das duas medidas. Este aparece na folha de resultados impressa pelo aparelho. O RFV obtido para cada amostra é interpretado pelo sistema VIDAS® da seguinte maneira: Valor do teste = RFV amostra/RFV calibrador. Estes valores testes são comparados com os limites introduzidos no sistema. O quadro abaixo indica os limites e a interpretação dos resultados.

Valor teste	Interpretação dos resultados
□ 0,13	Negativo
□ 0,13	Positivo

É impressa uma folha de resultados, na qual figuram as referências dos reagentes utilizados, a data e a hora, e para cada amostra, a sua identificação, o nome do teste, o RFV, o valor do teste e a interpretação. A amostra que apresentar um resultado com um valor teste inferior ao valor limite, indica uma amostra que não contém enterotoxinas ou que contém uma concentração de enterotoxinas inferior ao limite de detecção. Amostra que apresentar um resultado com um valor teste superior ou igual ao valor limite indica uma amostra contaminada. Um controle

positivo e um controle negativo está incluído em cada embalagem do sistema VIDAS® Staph enterotoxin II (SET2) (bioMérieux, 2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas 80 amostras de queijos de coalho analisadas verificou-se que 79 (98,75%) estavam contaminadas com *Staphylococcus* sp. e 43 (53,75%) com *Staphylococcus* coagulase positiva.

5.1 Incidência de *Staphylococcus* sp. (UFC/g) em amostras de queijos de coalho artesanais e industriais

Das 80 amostras de queijos de coalho analisadas, 79 (98,75%) estavam contaminadas com *Staphylococcus* sp. apresentando contagens com níveis superiores a 10^4 UFC/g (Tabela 7). Observou-se a incidência de *Staphylococcus* sp. em 100% das amostras analisadas de queijos de coalho artesanais do Ceará, de outros estados e nas amostras de queijos de coalho industriais com registro do SIE. Com exceção de apenas uma (4,35%) amostra de queijo de coalho industrializado com registro do SIF que não apresentou contagem de *Staphylococcus* sp. Esses resultados mostram uma porcentagem significativa (95,65%) de *Staphylococcus* sp. para os queijos industrializados.

Na Tabela 7 podemos observar que das 79 amostras de queijos de coalho contaminadas com *Staphylococcus* sp., 44 (55,69%) amostras foram de produções artesanais, sendo 33 (41,77%) do estado do Ceará com contagens variando de $6,0 \times 10^4$ UFC/g a $8,9 \times 10^7$ UFC/g e 11 (13,75%) de outros estados, variando de $2,2 \times 10^5$ a $8,9 \times 10^7$ UFC/g; 13 (16,25%) amostras de queijo de coalho industrial com registro

do SIE com contagens variando de $2,2 \times 10^5$ a $1,9 \times 10^7$ UFC/g e 22 (28,75%) amostras de queijo de coalho industrial com registro do SIF com contagens variando de $9,0 \times 10^4$ a $4,3 \times 10^7$ UFC/g.

Tabela 7 Incidência de *Staphylococcus* sp. (UFC/g) em amostras de queijos de coalho artesanais e industriais

<i>Staphylococcus</i> sp. UFC/g		Amostras de Queijo de Coalho							
		Artesanal				Industrial			
		Ceará		Outros Estados		SIE		SIF	
Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
1×10^4 - 1×10^5	1/33	3,03	-	-	-	-	1/22	4,54	
1×10^5 - 1×10^6	4/33	12,12	2/11	18,18	4/13	30,77	5/22	22,72	
1×10^6 - 1×10^7	19/33	57,57	5/11	45,45	6/13	46,15	14/22	63,63	
1×10^7 - 1×10^8	9/33	27,27	4/11	36,36	3/13	23,08	2/22	9,09	

Nas amostras de queijos de coalho artesanal e industrial verifica-se elevada incidência de *Staphylococcus* sp. com maior número de amostras (44) apresentando contagens entre 1×10^6 UFC/g a 1×10^7 UFC/g (Tabela 7), inclusive para amostras industrializadas que são fiscalizadas por órgãos oficiais e devem obedecer os requisitos mínimos de elaboração dos produtos, tendo a matéria-prima (leite) obrigatoriamente pasteurizada. Os queijos que apresentam SIE e SIF têm suas instalações inspecionadas por fiscais da Secretaria de Agricultura do Estado ou por fiscais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), enquanto que os queijos artesanais não são submetidos à inspeção.

Considerando que a legislação brasileira determina que todos os queijos elaborados a nível industrial, devem ser fabricados com leite pasteurizado e que esse processo é eficiente na destruição de estafilococos, a contaminação do queijo de coalho industrializado, pode ter ocorrido nas etapas pós-processo ou pode ser resultante de uma pasteurização não eficiente. Apesar da mudança na legislação

brasileira quanto aos requisitos microbiológicos para alimentos comercializados, que exige apenas detecção de estirpes de estafilococos coagulase positiva, inclusive em queijo de coalho, a presença de *Staphylococcus* sp. a níveis elevados (acima de 10^5 UFC/g) dependendo da espécie presente, pode indicar possível produção de enterotoxinas no alimento, além de condições higiênicas deficientes na fabricação.

A maioria dos queijos de coalhos artesanais são comercializados em temperaturas inadequadas (temperatura ambiente) e somente no final do dia são armazenados sob refrigeração. Segundo a Instrução Normativa N° 30 (BRASIL, 2001b) o queijo de coalho deverá manter-se a uma temperatura não superior a 12°C durante sua conservação e comercialização. Esse limite de temperatura não é eficiente, pois segundo Adams e Moss (1997) o *S. aureus* é capaz de produzir toxinas entre 10 e 45°C, tendo como faixa de temperatura ótima entre 35 a 40°C. De acordo com FDA citado por Jablonski e Bohach (2001) doses eficazes de enterotoxinas estafilocócicas podem ser alcançadas quando as populações de *S.aureus* são maiores que 10^5 UFC/g de alimento contaminado. Assim, controlando fatores que afetam o crescimento de *Staphylococcus*, a produção de enterotoxinas poderá ser controlada e conseqüentemente, os surtos de intoxicação estafilocócica alimentar.

Rapini et al. (2002) avaliaram 10 amostras de queijo de coalho comercializados em praias do Nordeste. A contagem para *Staphylococcus* sp. variou de $4,7 \times 10^4$ a $2,0 \times 10^7$ UFC/g. Foi observado que 100% das amostras apresentaram enumeração de *S.aureus* acima do nível máximo permitido (10^3 UFC/g) e detectado que a maioria das cepas de *S.aureus*, estafilococos coagulase negativo e *Staphylococcus* sp., produziram enterotoxinas podendo causar riscos à saúde pública.

Em Teresina-PI, Barbosa et al. (2004) analisaram 19 amostras de queijos de coalho, das quais 11% eram provenientes do Ceará. Foi detectado *Staphylococcus* sp. em 100% das amostras com contagens variando de 1×10^4 a $6,8 \times 10^9$ UFC/g. Das 19 amostras analisadas, 18 (94,74%) encontravam-se acima do padrão permitido pela legislação (5×10^2 UFC/g).

5.2 Incidência de *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de queijos de coalho artesanais e industriais

Das 43 amostras de queijo de coalho contaminadas com *Staphylococcus* coagulase positiva, 30 (69,77%) foram produzidas artesanalmente, sendo 23 (53,49%) amostras do Ceará, com contagens entre $1,2 \times 10^5$ UFC/g a $5,9 \times 10^7$ UFC/g e 7 (16,28%) amostras artesanais de outros estados, com contagens entre $6,9 \times 10^5$ UFC/g a $2,6 \times 10^7$ UFC/g; 13 (30,23%) foram produzidas a nível industrial, sendo 9 (20,93%) amostras industriais com registro do Serviço de Inspeção Estadual (SIE) com contagens entre $4,4 \times 10^4$ UFC/g a $1,7 \times 10^7$ UFC/g e 4 (9,30%) amostras industriais com registro do Serviço de Inspeção Federal (SIF) com contagens entre $4,7 \times 10^5$ UFC/g a $2,7 \times 10^6$ UFC/g.

UFC/g de *S. aureus*, onde apenas 10% das amostras encontravam-se em desacordo com os padrões microbiológicos vigentes (BRASIL, 1997). No entanto, Hiluy e Araújo (1999) evidenciaram que amostras de queijos de coalho apresentaram valores superiores, com contagem máxima de $6,5 \times 10^7$ UFC/g de *S.aureus*. Leite Júnior et al. (2000) em Campina Grande - PB, encontraram valores inferiores, em torno de 10^5 UFC/g em queijos de coalho artesanal.

Benevides et al. (2001) pesquisaram as características microbiológicas de 100 amostras de queijo de coalho elaborados a partir de leite cru e leite pasteurizado inoculado com fermento láctico selecionado, maturados sob diferentes temperaturas. Para *Staphylococcus* coagulase positiva foram observadas contagens de até $2,4 \times 10^6$ UFC/g considerados os diversos tempos de análises. Foi ressaltado que apesar de ter ocorrido redução no número de colônias/g de queijo durante a maturação, quase todas as contagens para *Staphylococcus* coagulase positiva estavam acima do limite permitido pela legislação (BRASIL, 2001a) evidenciando más condições do produto.

Oliveira (2002) analisou 74 amostras de queijo de coalho comercializado em Fortaleza-Ceará, quanto à presença de *S. aureus* coagulase positiva, das quais 34 (45,95%) amostras encontravam-se satisfatórias (contagem menor que 5×10^2 UFC/g) e 40 (54,05%) insatisfatórias (contagem maior que 5×10^2 UFC /g).

Índices elevados de estafilococos coagulase positiva, também foram constatados por Feitosa et al. (2003), que avaliaram a qualidade do queijo de coalho do estado do Rio Grande do Norte e observaram a ocorrência de estafilococos coagulase positiva em 8 (72,7 %) amostras com contagens variando de $7,0 \times 10^4$ a $1,3 \times 10^8$ UFC/g. Borges et al. (2003) relataram contagens elevadas de estafilococos

coagulase positiva em 39 (90,8%) das 43 amostras de queijos de coalho analisadas, com contagens variando de $1,0 \times 10^1$ a $2,9 \times 10^9$ UFC/g.

A presença de estafilococos coagulase positiva foi detectada em 46 (100%) amostras de queijos de coalho produzidos no Ceará (PICANÇO et al., 2004).

Viana et al. (2004) detectaram estafilococos coagulase positiva e outras bactérias em 20 amostras de queijo de coalho comercializados em Feira de Santana, Bahia, sendo dez amostras sem SI (Serviço de Inspeção Estadual ou Federal) e dez com SI, os resultados obtidos indicaram que o queijo sem SI encontrava-se com nível de estafilococos coagulase positiva acima do padrão estabelecido, para os queijos com SI, 70% das amostras estavam de acordo com a legislação.

As elevadas contagens de *Staphylococcus* sp. e *Staphylococcus* coagulase positiva, presentes nas amostras de queijos de coalho analisados, indicam precárias condições de higiene. A contaminação microbiológica é multifatorial, e pode ter sido devido à contaminação da matéria prima (leite) e/ou dos ingredientes utilizados na fabricação (coalho, cloreto de cálcio e cloreto de sódio), antes do processo de pasteurização; processo de pasteurização deficiente; ocorrência de contaminação pós-pasteurização, ou a pasteurização do leite não foi realizada. Esses níveis são preocupantes por não se enquadrarem nos padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Ministério da Saúde, cujo limite máximo permitido é de 10^3 UFC/g (BRASIL, 1996; BRASIL, 2001a).

Devido à natureza ubiqüitária do gênero *Staphylococcus*, eliminar completamente sua presença no ambiente industrial é praticamente impossível. Entretanto a prevenção da contaminação dos alimentos pode ser obtida através de

medidas como um rigoroso controle da matéria-prima, processamento adequado e implementação de um programa de higienização no ambiente industrial.

Sendo o homem o principal reservatório e a fonte de contaminação dos alimentos com *Staphylococcus*, as práticas de higiene por parte dos manipuladores são muito importantes: higiene pessoal perfeita; lavagem freqüente de mãos; uso de sabões bactericidas; uso de toalhas descartáveis; hábitos pessoais corretos (evitar tocar o pêlo, nariz e boca); evitar tossir, falar ou espirrar sobre os alimentos; evitar fumar e mascar chicle; manter os alimentos em refrigeração, evitando temperaturas elevadas. Em geral, deve evitar-se o contato direto dos alimentos com as mãos sempre que possível (ANDERSON, 1999).

A contaminação dos alimentos se dá por falta de higiene pessoal e manipulação inadequada de alimentos, e a incidência é maior para quem tem contato direto ou indireto com indivíduos doentes ou ambientes hospitalares. Nos surtos envolvendo alimentos, os manipuladores são a principal fonte de contaminação de *S. aureus* (OPAS, 2001).

O elevado número de *Staphylococcus* coagulase positiva encontrado nessa pesquisa poderia ser reduzido com aplicação efetiva da obtenção higiênica do leite, até o produto final. A obtenção do leite de animais não mastícticos é de fundamental importância para a obtenção de leite com baixos índices de *Staphylococcus*. Outro aspecto também de grande importância é a aplicação das Boas Práticas de Fabricação (BPF's) durante a elaboração de queijos, visando minimizar ou evitar a contaminação principalmente a partir de manipuladores, que devem ser treinados constantemente. A presença de lavatório com água potável, detergente bactericida e toalhas de papel descartáveis na área de produção,

exigência da Resolução-RDC N° 275 (BRASIL, 2002), e a freqüente lavagem das mãos reduziria a contaminação com espécies do gênero *Staphylococcus*.

A aplicação da refrigeração, em temperaturas inferiores a 7°C em toda a cadeia produtiva do leite para o controle dos microrganismos é de fundamental importância, já que se evita a multiplicação dos mesmos e, portanto a elaboração de enterotoxinas. A matéria-prima (leite) deve ser refrigerada logo após a ordenha e armazenada abaixo de 7°C, assim como o produto final (queijo de coalho).

5.3 Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijos de coalho artesanais e industriais

Pode-se observar nos resultados da Tabela 9, que não foram detectadas enterotoxinas estafilocócicas em nenhuma das 43 amostras de queijos de coalho artesanal e industrial analisadas. Todas as amostras apresentaram resultados com um valor teste inferior ao valor limite (valor teste \leq 0, 13, teste positivo), isto indica que as amostras não contêm enterotoxinas estafilocócicas ou que contêm uma concentração de enterotoxinas inferior ao limite de detecção do método, apesar das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva serem elevadas e estarem na faixa que permite produção de enterotoxinas.

Tabela 9 Resultados da detecção de enterotoxinas estafilocócicas através do Método ELFA no aparelho Mini VIDAS® em amostras de queijos de coalho artesanais e industriais

Amostras	Branco	Valor Teste	RFV	Resultado
A1	160	0,02	79	Negativo
A2	164	0,02	80	Negativo
A3	160	0,02	77	Negativo
A4	158	0,02	79	Negativo
A5	163	0,02	80	Negativo
A6	162	0,02	83	Negativo
A7	160	0,02	79	Negativo
A8	160	0,02	75	Negativo
A9	160	0,02	99	Negativo
A10	161	0,02	84	Negativo
A11	165	0,02	91	Negativo
A12	164	0,02	92	Negativo
A13	165	0,02	77	Negativo
A14	164	0,03	137	Negativo
A15	161	0,02	75	Negativo
A16	163	0,03	114	Negativo
A17	162	0,02	107	Negativo
A18	162	0,02	87	Negativo
A19	164	0,02	73	Negativo
A20	164	0,02	77	Negativo
A21	164	0,02	85	Negativo
A22	164	0,02	79	Negativo
A23	167	0,02	77	Negativo
A24	165	0,01	62	Negativo
A25	167	0,02	74	Negativo
A26	165	0,01	67	Negativo
A27	158	0,02	84	Negativo
A28	161	0,03	128	Negativo
A29	160	0,02	73	Negativo
A30	161	0,02	75	Negativo
A31	161	0,02	77	Negativo
A32	161	0,02	78	Negativo
A33	156	0,02	89	Negativo
A34	161	0,02	81	Negativo
A35	164	0,02	91	Negativo
A36	163	0,02	77	Negativo
A37	162	0,02	79	Negativo
A38	161	0,01	71	Negativo
A39	159	0,02	74	Negativo
A40	162	0,02	73	Negativo
A41	162	0,02	76	Negativo
A42	160	0,02	77	Negativo
A43	160	0,02	78	Negativo

Rapini et al. (2002) evidenciaram a produção de enterotoxinas estafilocócicas em contagens de 10^4 UFC/g de *Staphylococcus* sp. em queijos de coalho comercializados no Nordeste do Brasil.

Em Minas Gerais, na Região do Serro, Pinto et al. (2004) analisaram 14 amostras de queijos de Minas artesanais e não detectaram enterotoxinas estafilocócicas em contagens máxima de $1,0 \times 10^7$ UFC/g de *S.aureus* nos queijos analisados.

Araújo et al. (2005) avaliaram 47 amostras de queijos Minas artesanais produzidos na Região de Araxá quanto à presença de *S.aureus* e suas enterotoxinas. A detecção de enterotoxinas foi realizada pelo método do sistema VIDAS[®] Staph enterotoxin (SET) (bioMérieux) e em nenhuma das amostras foram detectadas enterotoxinas estafilocócicas.

Borges et al. (2005) avaliaram ocorrência de enterotoxinas estafilocócicas através do sistema VIDAS[®] Staph Enterotoxin II (bioMérieux), na linha de produção de queijo de coalho. Foi constatada a presença de enterotoxinas em 20% (4/20) das amostras analisadas (leite cru, no leite pasteurizado, na coalhada e no queijo obtido a partir desse leite).

5.4 Detecção de produção de enterotoxinas estafilocócicas em cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de queijos de coalho artesanais e industriais

De acordo com a Tabela 10, dos 12 “pools” de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva submetidos à detecção de enterotoxinas estafilocócicas pelo método ELFA no sistema VIDAS[®], somente um (8,33%) (“pool” 12) foi capaz de

produzir enterotoxinas estafilocócicas, tendo resultado positivo para enterotoxinas estafilocócicas.

Tabela 10 Resultados da detecção de enterotoxinas estafilocócicas através do Método ELFA no aparelho Mini VIDAS® em cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* isoladas de queijos de coalho artesanais e industriais

Pools de Cepas	Branco	Valor Teste	RFV	Resultado
1	161	0,02	74	Negativo
2	161	0,02	72	Negativo
3	161	0,02	77	Negativo
4	161	0,02	71	Negativo
5	160	0,01	68	Negativo
6	160	0,01	64	Negativo
7	158	0,02	89	Negativo
8	163	0,01	70	Negativo
9	160	0,06	222	Negativo
10	162	0,02	77	Negativo
11	163	0,02	74	Negativo
12	162	2,99	10720	Positivo

O “pool” de cepas que teve resultado positivo para produção de enterotoxinas estafilocócicas foi isolado de uma amostra de queijo de coalho artesanal, com contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* de $1,7 \times 10^7$ UFC/g de queijo analisado.

Em Recife, Sena et al. (1997) detectaram várias enterotoxinas nos pools de cepas isolados de queijos de coalho testados. Foram identificados os seguintes resultados: dos 78 “pools” de *S. aureus*, 48 (61,5%) produziram enterotoxina B; 10 (12,9%), toxina C e 2 (2,5%), produziram toxina D. Dos 11 “pools” de *S. intermedius*, 7 (63,6%), produziram toxina B e os “pools” de *S. epidermidis* e de *S. hyicus* não produziram enterotoxinas.

6 CONCLUSÕES

Foi constatado elevado nível de contaminação, com relação a *Staphylococcus* sp. e *Staphylococcus* coagulase positiva, nos queijos de coalho artesanais (sem inspeção) e industriais (com inspeção do SIE ou do SIF) analisados, evidenciando a necessidade de uma aplicação efetiva de boas práticas em toda a cadeia produtiva de elaboração do queijo de coalho, bem como de uma avaliação do sistema de fiscalização por parte dos órgãos responsáveis.

A redução da população de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo de coalho pode ser obtida através da ordenha higiênica do leite a partir de vacas sãs e aplicação de boas práticas de fabricação durante todo o processo produtivo, visando minimizar ou evitar a contaminação principalmente a partir de manipuladores, que devem ser treinados constantemente.

Embora cerca de 54% dos queijos de coalho analisados estivessem impróprios para consumo por apresentarem contaminação elevada com *Staphylococcus* coagulase positiva, não foi detectada a presença de enterotoxina estafilocócica em nenhuma dessas amostras.

Somente um (8,33%) dos “pools” de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de queijo de coalho artesanal foi capaz de produzir enterotoxinas estafilocócicas.

É recomendável uma revisão nos padrões microbiológicos para queijo de média a alta umidade na Resolução-RDC N.º 12 (BRASIL, 2001a), uma vez que uma elevada contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva pode não corresponder à presença de enterotoxinas estafilocócicas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza (España): Editorial Acribia, S. A. 1997. p. 258-264. 464p.

ANDERSON, M. del R.P. **Guías y manuais técnicos, Microbiología Alimentaria: detección de bacterias con significado higiénico-sanitario**. Ministerio de Sanidad y Consumo. Instituto de Saúde "Carlos III". Madrid, 1989. p. 189-221. 440p.

ANDRADE, A. S. A. de. et al. **Características físico-químicas de queijos de coalho industriais e artesanais produzidos no estado do Ceará**. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, v. 60, nº 345, p. 214-217, jul./ago. 2005. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 22, 2005, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora, 2005.

ARAÚJO, R. A. B. et al. **Avaliação de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas artesanal produzido na região de Araxá**. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 14, Goiânia-GO, 2005. **Anais...** Goiânia, 2005.

BADINI, K. B. et al. **Risco à saúde representado pelo consumo de leite cru comercializado clandestinamente**. Revista Saúde Pública, São Paulo, v.30, nº 6, p.549-552, mai. 1996.

BARBOSA, S. S. et al. **Detecção de *Staphylococcus* sp. em queijos de coalho adquiridos em Teresina-Piauí**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, Recife-PE, 2004. **Anais...** Recife, 2004. CD-ROM.

BARRETO, M. G. F. et al. **Monitoramento da qualidade microbiológica de do queijo de coalho preparado em algumas regiões do estado do Ceará, de relevante importância no estudo dos dados epidemiológicos em casos de VEDTAs**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17, 2000, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza, 2000, v.1, p. 4.57.

BASTOS, M. do S. R. et al. **Inspeção em uma indústria produtora de queijo tipo coalho no estado do Ceará, visando à implantação de boas práticas de fabricação**. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 18, 2001, Juiz de Fora, **Anais...** Juiz de Fora, 2001, p. 130-136.

BENEVIDES, S. D. **Comportamento do queijo de coalho produzido com leite cru e pasteurizado, maturado a temperatura ambiente e sob refrigeração.** 1999. 132p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, 1999.

BENEVIDES, S. D. et al. **Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo de coalho produzido com leite cru e pasteurizado no estado do Ceará.** Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba, v.19, nº 1, p. 139-153, jan. /jun. 2001.

BENEVIDES, S. D.; TELLES, F. J. S. **Características microbiológicas, de armazenamento e de embalagem de queijos tipo “coalho” comercializados na cidade de Fortaleza, CE.** Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 16, nº 95, p.44-47, abr. 2002.

BIOMÉRIEUX, S.A. **VIDAS® Staph enterotoxin II (SET2)** catálogo do kit. Marcy-l'Etoile, França, 2003.

BORGES, M. de F. et al. **Qualidade microbiológica de queijo de coalho e manteiga da terra produzidos no estado do Ceará.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17, 2000, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza, 2000, v.1, p. 4.72.

BORGES, M. de F. et al. **Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no estado do Ceará, Brasil.** Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba, v.21, nº 1, p. 31-40, jan./jun. 2003.

BORGES, M. de F. et al. **Enterotoxina estafilocócica em queijo de coalho industrializado.** Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”, Juiz de Fora, v.60, nº 345, p. 224-227, jul./ago. 2005. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 22, 2005, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora, 2005.

BRABES, K. C. S. et al. **Produção e classificação de enterotoxinas estafilocócicas produzidas por cepas provenientes de leite de bovinos leiteiros com mastite.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17, 2000, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza, 2000, v.1, p. 4.12.

BRABES, K. C. S. et al. **Identificação e classificação de enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus* spp. isolados de ar de ambiente, manipuladores e de superfícies em uma indústria de laticínios.** In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 21, 2004, Juiz de Fora, MG. **Anais...** Juiz de Fora, 2004, p. 186-190.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Divisão Nacional de Alimentos (DINAL). Portaria Nº 01 de 28 de janeiro de 1987. **Aprova Padrões Microbiológicos para Produtos Alimentícios expostos à venda ou de alguma forma destinados ao consumo.** Brasília, DF. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>>. Acesso em: 14 set. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos.** Disponível em: <http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=1218>>. Acesso em: 12 set. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 451 de 28 de setembro de 1997. **Regulamento Técnico. Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos.** Brasília, DF. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>>. Acesso em: 14 set. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução Nº 12 de 02 de janeiro de 2001(a). **Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos.** Brasília, DF. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>>. Acesso em: 14 set. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução – RDC Nº 275 de 21 de outubro de 2002. **Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos.** Brasília, DF. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>>. Acesso em: 04 mai. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 30, de 26 de junho de 2001(b). ANEXO II - **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho.** Diário Oficial nº 136-E, segunda-feira, 16 de julho de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. FNS. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Geral de Vigilância Epidemiológica. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica, Alimentar e Sexual. **Distribuição de ocorrência de surtos notificados por doenças transmitidas por alimentos e número de doentes acometidos por Região e Unidade Federada, Brasil, 1999 a 2002.** Dados preliminares até 20/06/2002. Brasília, 2002.

BRASIL. Secretaria da Saúde do Estado do Ceará. Núcleo de Epidemiologia. Célula de Vigilância Epidemiológica. **Informe anual de surtos das doenças transmitidas por alimentos, Ceará.** Fortaleza, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Seção de Inspeção de Produtos de Origem Animal-SIPA. **SERVIÇO DE INSPEÇÃO FEDERAL (SIF) do Ceará**. Setor de Estatística. Fortaleza, 2005.

BRETT, M. M. **Kits for the detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits**. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, 1998, **84**, 110S-118S.

CANADA. Health Protection Branch. Ottawa. **Enumeration of Staphylococcus aureus in foods**. Government of Canada. 2000. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/compendium/volume_2/e_mfhpb21e15.html. Acesso em: 19 ago. 2004.

CARMO, L. S. do. **Intoxicação Alimentar**. Revista Minas faz ciências nº 11, junho a agosto de 2002, FAPEMIG. Disponível em: <<http://revista.fapemig.br/11/index.html>>. Acesso em: 24 jun. 2004.

CARMO, L. S. do. et al. **Food poisoning due to enterotoxigenic strains of Staphylococcus present in Minas cheese and raw milk in Brazil**. Food microbiology, v.19, p. 9-14, 2002. Disponível em: <<http://www.ideallibrary.com>>. Acesso em: 11out. 2004.

CARVALHO, G. de. **A ciência do queijo de coalho. Sabor Artesanal**. Diário do Nordeste, Fortaleza, 01dez. 2003. Caderno 3, p.3.

CENCI-GOGA, B. T. et al. **Enterotoxin production by Staphylococcus aureus isolated from mastitic cows**. Journal of Food Protection, v.66, nº 9, p. 1693-1696, 2003.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. **Staphylococcus enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.22, nº 3, p.263-271, set./dez. 2002.

FEITOSA, T. et al. **Pesquisa de Salmonella sp., Listeria sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte**. Ciências e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.23 (supl.); p.162-165, dez. 2003.

FLORENTINO, E. R.; MARTINS, R. S. **Características microbiológicas do “queijo de coalho” produzido no estado da Paraíba**. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.13, nº 59, p. 43-48, jan./fev. 1999.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Tradução: Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt. Porto Alegre: Artemed editora, 2002. p. 171-173. 424p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996. 182 p.

GUEDES NETO, L. G. et al. **Qualidade físico-química e microbiológica de queijo de coalho produzido no Brasil – Revisão**. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 21, 2004, Juiz de Fora, MG. **Anais...** Juiz de Fora, 2004, p. 236-239, Juiz de Fora, 2004.

HILUY, D. J.; ARAUJO, R. E. S. **Avaliação da qualidade microbiológica de queijos de coalho comercializados em Fortaleza-CE**. Núcleo de Vigilância Sanitária / SMDS/PMF. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.13, nº. 61, p.28-36. Resumos, abr./mai. 1999.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9th edition. Baltimore, Maryland 21202 USA: Williams & Wilkins Co, 1994. p.527-551.

HOLECKOVÁ, B. et al. **Ocurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food**. Ann Agric Environ Med, v.9, p. 179-182, 2002. Disponível em: <<http://www.aaem.pl/pdf/aaem0228.htm>>. Acesso em: 17 jul. 2004.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in Foods 5 – Microbiological Specifications of foods pathogens**. v.5. London: Blackie Academic & Professional, 1996. p.299-303. 513p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in Foods 6 – Microbiological Ecology of Food Commodities**. v.6. London: Blackie Academic & Professional, 1998. p.521-559. 615p.

JABLONSKI, L. M.; BOHACH, G. A. ***Staphylococcus aureus***. In: Doyle, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 2nd Edition. Washington, DC: ASM Press, 2001. p. 411-434. 872 p.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. Fifth Edition. USA: Chapman & Hall, 1996. p.429-450. 661p.

LAMAITA, H. C. et al. **Detecção das enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C e D) a partir de cepas de coagulase positivo e negativo isoladas de amostras de leite cru coletadas de tanques refrigeradores**. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.17, nº 104/105, p.91-92. Resumos, jan./fev. 2003 (a).

LAMAITA, H. C. et al. **Detecção da Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) a partir de cepas de coagulase positivo e negativo isoladas de amostras de leite cru em propriedades rurais de Minas gerais**. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.17, nº 104/105, p.93-94. Resumos, jan./fev. 2003 (b).

LAMAITA, H. C. et al. **Freqüência de Staphylococcus sp. isolados à partir de amostras de leite cru coletado em diferentes propriedades rurais no estado de Minas Gerais**. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.17, nº 104/105, p.92-93. Resumos, jan./fev. 2003 (c).

LAMAITA, H. C. et al. **Detecção de Staphylococcus sp. de enterotoxinas estafilocócicas e de TSST-1 em leite de tanques refrigeradores**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo, RS. **Anais...** Passo Fundo, 2004. CD-ROM.

LANCETTE, G. A.; BENETT, R. W. **Staphylococcus aureus and Staphylococcal enterotoxins**. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. APHA. 4ª ed. Washington, DC, 2001. p.387-400.

LEITE JUNIOR, A. F. S. et al. **Qualidade microbiológica do queijo coalho comercializado à temperatura ambiente sob refrigeração, em Campina Grande - PB**. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 14, nº 73, p 53-59, 2000.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M.; **Review: Staphylococcus aureus and food poisoning**. Genetics and Molecular Research (GMR), France, v.2, nº1, p.63-76, 2003. Disponível em: <<http://www.funpecrp.com.br>>. Acesso em: 17 jan. 2005.

MARSHALL, R.T. **Standard methods for examination of dairy products**. 16th edition. Washington, DC: APHA. 1992. 546 p.

MENDES, E. S. et al. **Staphylococcus aureus, Salmonella sp. e Coliformes em queijos de “coalho” comercializados em Recife**. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 13, nº 66-67, p. 122-126, nov./dez. 1999.

MENEZES, E. A. et al. ***Staphylococcus aureus* em queijos de coalho comercializados no estado do Ceará.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17, 2000, Fortaleza, CE. **Resumos...** Fortaleza, 2000, v.1, p. 4.104.

NASCIMENTO, F. R. R. et al. **Ações da Vigilância Sanitária perante as condições higiênico-sanitárias do queijo de coalho comercializado no município de Fortaleza.** In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 18, 2001, Juiz de Fora, MG. **Anais...** Juiz de Fora, p. 257-261.

NASSU, R. T. et al. **Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no estado do Ceará.** Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.15, nº 89, p.28-36, out. 2001.

NICOLAU, E. S. et al. **Avaliação do potencial de produção e tipos de enterotoxinas estafilocócicas encontradas em linhagens de *Staphylococcus aureus* e extratos de amostras de queijo tipo mussarela fabricado na região de Goiânia-GO.** In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 18, 2001, Juiz de Fora, MG. **Anais...** Juiz de Fora, p. 92-100.

NORMANNO, G. *et al.* **Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy.** International Journal of Food Microbiology nº 98, p.73-79, 2005. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro>>. Acesso em: 23 jan. 2005.

OLIVEIRA, A. M. de. **Investigação do comportamento de estafilococos enterotoxigênicos coagulase negativos, em alimentos.** 1999. 101p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, São Paulo, 1999.

OLIVEIRA, M.T de. ***Staphylococcus aureus* coagulase positiva em queijo de coalho, comercializado em Fortaleza no período de 1999, 2000 e 2001.** 2002. 41p. Monografia (Especialização em Alimentos e Saúde Pública). Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Fortaleza, Ceará, 2002.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE - OPAS. **HACCP: Instrumento essencial para a inocuidade de alimentos.** Buenos Aires, Argentina: OPAS/INPPAZ, 2001. p. 174-176. 333 p.

PAIVA, M. S. D.; CARDONHA, A. M. S. **Queijo de coalho artesanal e industrializado produzidos no Rio Grande do Norte: Estudo comparativo da qualidade microbiológica.** Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.13, nº 61, p. 33. Resumos, abr./mai. 1999.

PEREIRA, M. L. et al. **Estafilococos e alimentos: Possibilidades de disseminação através do portador humano e animal.** Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.13, nº 66/67, p.48-55, nov./dez. 1999 (a).

PEREIRA, M. L. et al. **Enterotoxinas Estafilocócicas: Importância e métodos de detecção.** Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.13, nº 64, p.24-33, set. 1999 (b).

PEREIRA, M. L. et al. **Estafilococos: Até onde sua importância em alimentos?** Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.14, nº 68/69, p.32-40, jan./fev. 2000.

PINTO, et al. **Queijo Minas artesanal da Região do Serro: Avaliação de *Staphylococcus aureus* e suas enterotoxinas.** Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, v. 59, nº 336 a 338, p. 82-86, jan./jun. 2004.

PIMBLEY, D.W.; PATEL, P. D. **A review of analytical methods for the detection of bacterial toxins.** Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, **84**, 98S-109S. 1998

PICANÇO, Y. V. C. et al. **Contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase-positiva em queijo tipo "coalho" comercializado em Fortaleza.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA MEDICINA LABORATORIAL, 38, Florianópolis-SC, 2004. Disponível em: <<http://www.sbpc.org.br>>. Acesso em 13 out. 2004.

RAPINI, L. S. et al. **Pesquisa de *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Listeria* sp. e *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo tipo coalho.** In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 19, 2002, Juiz de Fora, MG. **Anais...** Juiz de Fora, p.60-65, 2002.

SABIONI, J. G.; NASCIMENTO, D. do; PEREIRA, J. L. **Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo Minas em Ouro Preto (MG), 1992.** Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.8, nº 33, set. 1994.

SEBRAE/CE. **Projeto de melhoria da qualidade do queijo de coalho produzido no estado do Ceará.** Séries Estudos Tecnológicos. Fortaleza, 1998. p. 54-56. 208 p.

SENA, M. J. et al. **Identificação de *Staphylococcus* e detecção de enterotoxinas em queijos tipo “coalho” comercializados em Recife (PE) utilizando-se o método OSP (Sensibilidade Ótima em Placas)**. In: CONGRESSO NACIONAL DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 4, Olinda, PE. **Anais...** Olinda, 1997.

SILVA, M. C. C. et al. **Levantamento dos surtos de toxinfecção alimentar ocorridos no período de 2000 a 2003 no estado de Minas Gerais**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22, 2003, Florianópolis, SC. **Resumos...** Florianópolis, 2003. Disponível em: <<http://www.sbm.org.br>> Acesso em: 24 jan. 2005.

SILVA, W. P. da; GANDRA, E. A. **Estafilococos Coagulase Positiva: Patógenos de Importância em Alimentos**. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.18, nº. 122, p.32-40, jul. 2004.

SILVA, M. M. e.; SIQUEIRA, S. C.; DIAS, R. S. **Detecção de linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo envolvidos em surtos de intoxicação alimentar**. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 14, Goiânia-GO, 2005. **Anais...** Goiânia, 2005.

SIRVETA - **SISTEMA DE INFORMACION PARA LA VIGILANCIA DE LAS ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS**. Disponível em: <http://www.panalimentos.org/sirveta/e/report_eta01.asp>. Acesso em: 21 maio 2005.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M. da; CUNHA NETO, A. da. **Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. Isolados de leite *in natura***. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, Recife-PE, 2004. **Anais...** Recife, 2004. CD-ROM.

TARELHO, S. Sem garantia de qualidade. Queijo coalho consegue furar fiscalização. **Diário do Nordeste On line**, Fortaleza, 14 jun. 2003. Disponível em: <<http://www.diariodonordeste.com.br>>. Acesso em: 11 out. 2004.

THOMASI, A. Queijos ganham selo de qualidade. **Gazeta Mercantil On line**, São Paulo, 13 mar. 2003. Disponível em: <<http://www.gazetamercantil.com.br>> Acesso em: 11 out. 2004.

TRANter, H. S. **A Lancet Review. Foodborne illness**. Foodborne Staphylococcal illness. London, 1991. p. 97-101. 146 p.

VERAS, J. F. et al. **Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil.** Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.17, nº 104/105. p. 218-219. Encarte, jan./fev. 2003.

VERNOZY-ROZAND, C. et al. **Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food.** Letters in Applied Microbiology, v. 39, p. 490-494, Marcy l'étoile, France, 2004.

VIANA, A. C. et al. **Qualidade microbiológica do queijo de coalho.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, Recife-PE, 2004. **Anais...** Recife, 2004. CD-ROM.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)