

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DIAGNÓSTICO DA CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM
UMA INDÚSTRIA PROCESSADORA DE QUEIJO DE COALHO E DETECÇÃO
DE GENES ASSOCIADOS A FATORES DE VIRULÊNCIA**

**MARIA DE FATIMA BORGES
Farmacêutica Bioquímica
Mestre em Microbiologia Agrícola**

**ARNALDO YOSHITERU KUAYE
Orientador**

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do Título de
Doutor em Tecnologia de Alimentos**

**Campinas, SP
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B644d Borges, Maria de Fatima
Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em
uma indústria processadora de queijo de coalho e detecção de
genes associados a fatores de virulência / Maria de Fatima
Borges. – Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Enterotoxinas. 3.
Estafilococos. 4. Virulência. 5. Queijo. I. Kuaye, Arnaldo
Yoshiteru. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Diagnostic foodborne pathogenic bacteria contamination in
“coalho” cheese processing plant and detection of
virulence-associated genes

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Listeria monocytogenes*, Enterotoxin,
Staphylococcus, Virulence, Cheese

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Arnaldo Yoshiteru Kuaye

José Luiz Pereira

Walkíria Hanada Viotto

Edna Froeder Arcuri

Renata Tieko Nassu

Maria Helena Castro Reis Passos

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

MARIA DE FATIMA BORGES

**DIAGNÓSTICO DA CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM UMA
INDÚSTRIA PROCESSADORA DE QUEIJO DE COALHO E DETECÇÃO DE GENES
ASSOCIADOS A FATORES DE VIRULÊNCIA**

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
Título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

Aprovado em: 25/08/2006

Campinas, 25 de agosto de 2006

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Orientador

Prof. Dr. José Luiz Pereira
Membro

Profa. Dra. Walkíria Hanada Viotto
Membro

Pesquisadora Dra. Edna Froeder Arcuri
Membro

Pesquisadora Dra. Renata Tieko Nassu
Membro

Profa. Dra. Maria Helena Castro Reis Passos
Membro

*Ao Olmar, pelo incentivo e
compreensão e aos nossos filhos
Graziela e Gustavo pelo amor e
carinho.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Arnaldo Yoshiteru Kuaye pela orientação, confiança e incentivo na realização deste trabalho;

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. José Luiz Pereira, Profa. Dra. Walkíria Hanada Viotto, Pesquisadora Dra. Edna Froeder Arcuri, Pesquisadora Dra. Renata Tieko Nassu e Profa. Dra. Maria Helena Castro Reis Passos pelas valiosas sugestões e correções da tese;

Aos meus pais Jovino (*em memória*) e Doracina, à minha Irmã Aurora e os meus irmãos Cristiano, Ambrolino, Orides, Jesualdo e Genebaldo e aos sobrinhos pelo carinho e convívio familiar;

À Dra. Dirce Kabuki, a Dra. Laura Maria Bruno, a Dra. Terezinha Feitosa Machado, ao Dr. Gilson Manfio, e ao Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto pelo apoio técnico e incentivo;

Aos professores Dr. Pedro Eduardo de Felício, Dra. Hilary Castle de Menezes e Dr. Carlos R. F. Grosso pelo apoio e incentivo;

À Norma Teruko Nago Miya e a Creusa Kasumi Nomura pelo apoio técnico;

À conselheira acadêmica Dra. Déborah dos Santos Garruti pelo apoio e incentivo;

Aos sobrinhos Jacson e Flávia pela colaboração e amizade;

Aos colegas Eduardo, Renata Torrezan, Dayse, Luciana, Karen, Renata Perez, Gina, Karina, Clarissa, Noemi, Juliane Ana Paula, Natália, Cristiane e Ana Amélia pela amizade e incentivo;

A todos que diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, em especial aos Departamentos de Tecnologia de Alimentos e de Ciências de Alimentos pelo apoio na realização do curso;

À Embrapa Agroindústria Tropical por permitir o afastamento para a realização do curso e apoio técnico durante a execução deste trabalho;

À Embrapa Gado de Leite pelo apoio técnico durante a execução deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo 502929/2003-0) pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	Xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	Xv
RESUMO GERAL	Xvii
GENERAL SUMMARY	Xxi
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
1. QUEIJO DE COALHO	7
1.1. Importância e Características do Queijo de Coalho	7
1.2. Processamento do Queijo de Coalho	9
2. MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS DE IMPORTÂNCIA EM QUEIJOS	10
2.1. Grupo coliforme fecal e <i>Escherichia coli</i>	12
2.1.1. Características dos coliformes fecais e <i>E. coli</i>	12
2.1.2. Incidência de coliformes fecais e surtos de <i>E. coli</i> associados ao consumo de leite e produtos lácteos	13
2.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	14
2.2.1. Características taxonômicas e bioquímicas do gênero <i>Listeria</i>	14
2.2.2. Listeriose	15
2.2.3. Patogenicidade e genes de virulência de <i>L. monocytogenes</i>	16
2.2.4. Métodos de subtipagem de <i>L. monocytogenes</i> e sua aplicação	18
2.2.5. Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> em queijos e indústrias de laticínios	19
2.2.6. Surtos e casos de listeriose associados ao consumo de leite e produtos lácteos	24
2.3. <i>Salmonella</i> sp.	27
2.3.1. Características taxonômicas e bioquímicas do gênero <i>Salmonella</i>	27

2.3.2. Doenças causadas por <i>Salmonella</i> sp.	28
2.3.3. Patogenicidade e fatores de virulência de <i>Salmonella</i> sp.	29
2.3.4. Incidência, ocorrência de casos esporádicos e surtos de salmonelose associados de leite e produtos lácteos	30
2.4. <i>Staphylococcus</i> enterotoxigênicos coagulase positiva e negativa	33
2.4.1. Características do gênero <i>Staphylococcus</i>	33
2.4.2. Intoxicação estafilocócica	35
2.4.3. <i>Staphylococcus</i> enterotoxigênicos	36
2.4.4. Enterotoxinas estafilocócicas e genes codificadores	37
2.4.5. Ocorrência de <i>Staphylococcus</i> enterotoxigênico e de enterotoxinas em leite e produtos lácteos	42
2.4.6. Surtos de intoxicação estafilocócica associados ao consumo de produtos lácteos	47
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
CAPÍTULO II	87
AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR COLIFORMES FECAIS, <i>Escherichia coli</i>, <i>Listeria monocytogenes</i> E <i>Salmonella</i> sp. EM UMA INDÚSTRIA PROCESSADORA DE QUEIJO DE COALHO	87
RESUMO	89
1. INTRODUÇÃO	90
2. MATERIAL E MÉTODOS	94
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
4. CONCLUSÕES	112
5. AGRADECIMENTOS	113
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
CAPÍTULO III	125
PERFIL DE CONTAMINAÇÃO POR <i>Staphylococcus</i> sp. E <i>Staphylococcus</i> COAGULASE POSITIVA E DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS EM UMA LINHA DE PRODUÇÃO DE QUEIJO DE COALHO	125
RESUMO	127
1. INTRODUÇÃO	128

2. MATERIAL E MÉTODOS	136
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	139
4. CONCLUSÕES	151
5. AGRADECIMENTOS	151
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
CAPÍTULO IV	167
IDENTIFICAÇÃO DE <i>S. aureus</i> UTILIZANDO A TÉCNICA DE PCR PARA O GENE <i>femA</i> E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO DE ISOLADOS DE <i>Staphylococcus</i> spp. ATRAVÉS DA AMPLIFICAÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE ENTEROTOXINAS	167
RESUMO	169
1. INTRODUÇÃO	170
2. MATERIAL E MÉTODOS	174
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	178
4. CONCLUSÕES	187
5. AGRADECIMENTOS	188
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	188

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Incidência de <i>L. monocytogenes</i> em queijos em vários países.	21
Tabela 2. Surtos e casos de listeriose associados ao consumo de leite e produtos lácteos.	25
Tabela 3. Espécies e subespécies do gênero <i>Salmonella</i> .	27
Tabela 4. Surtos de salmonelose associados ao consumo de leite e produtos lácteos.	32
Tabela 5. Parâmetros importantes para crescimento de <i>S. aureus</i> e produção de enterotoxinas em alimentos.	35
Tabela 6. Tipos de enterotoxinas estafilocócicas e genes codificadores.	39
Tabela 7. Relatos de surtos de intoxicação estafilocócica atribuídos ao consumo de produtos lácteos no Brasil, no período de 1993-2002.	49
Tabela 8. Resultados da contagem de coliformes totais e fecais e da pesquisa de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> sp. em leite e produtos lácteos de uma linha de produção de queijo de coalho.	102
Tabela 9. Perfil de identificação de isolados característicos do gênero <i>Listeria</i> obtido em uma linha de produção de queijo de coalho.	106
Tabela 10. Monitorização das condições de higiene de superfícies que contatam alimentos em uma linha de produção de queijo de coalho, pelo método ATP (Bioluminescência).	110
Tabela 11. Monitoramento da contaminação microbiológica do ar ambiente em uma linha de produção de queijo de coalho.	112
Tabela 12. Contagem de <i>Staphylococcus</i> sp. e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em uma linha de produção de queijo de coalho.	140

Tabela 13.	Contagem de <i>Staphylococcus</i> sp. em superfícies de equipamentos, móveis e utensílios em uma linha de produção do queijo de coalho.	144
Tabela 14.	Perfil de espécies de <i>Staphylococcus</i> isoladas na uma linha de produção de queijo de coalho (<i>API[®] Staph</i> – <i>BioMérieux</i>).	145
Tabela 15.	Detecção imunoenzimática (ELFA - <i>VIDAS[®] Staph enterotoxin II</i>) de enterotoxina estafilocócica em uma linha de produção de queijo de coalho.	149
Tabela 16	Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas PCR para detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas.	177
Tabela 17.	Confirmação da identificação de cepas <i>S. aureus</i> isoladas em uma linha de produção de queijo de coalho, através da técnica PCR.	179
Tabela 18.	Pesquisa de genes de enterotoxinas estafilocócicas em 12 cepas de <i>Staphylococcus</i> spp., isoladas em uma linha de produção de queijo de coalho, utilizando técnica PCR.	181

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figuras 1. Fluxograma de processamento do queijo de coalho, pontos de coleta e número de amostras coletadas para pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> .	96
Figuras 2. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os <i>primers</i> LM1 e LM2 para gene <i>hly</i> específico de <i>L. monocytogenes</i> .	107
Figuras 3. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os <i>primers</i> LM1 e LM2 para gene <i>hly</i> específico de <i>L. monocytogenes</i> .	108
Figuras 4. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os <i>primers</i> actA-F e actA-R para gene <i>actA</i> específico de <i>L. monocytogenes</i> .	109
Figuras 5. Fluxograma de processamento do queijo de coalho, pontos de coleta e número de amostras coletadas para análise de <i>Staphylococcus</i> sp.	137
Figuras 6. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os <i>primers</i> femA1 e femA2 para o gene <i>femA</i> específico para <i>S. aureus</i> .	180
Figuras 7. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os <i>primers</i> SEB1 / SEB2 e SEC1 / SEC2 para os genes <i>seb</i> e <i>sec</i> específicos das enterotoxinas estafilocócicas SEB e SEC.	182
Figuras 8. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os <i>primers</i> SEA1 e SEA2 para o gene <i>sea</i> específico da enterotoxina estafilocócica SEA.	183

RESUMO GERAL

O queijo é considerado um veículo freqüente de patógenos de origem alimentar e, em especial os queijos frescos artesanais. Dentre estes, destaca-se o queijo de coalho por ser comumente elaborado a partir de leite cru e sob condições insatisfatórias de higiene, em pequenas indústrias que não adotam de forma plena as Boas Práticas de Fabricação (BPF). Portanto, a contaminação microbiológica deste produto assume destacada relevância para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos. Neste trabalho, foi realizado um diagnóstico da contaminação por coliformes fecais, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus* spp. na linha de produção de queijo de coalho em uma indústria de laticínios, na região metropolitana de Fortaleza - CE. Um total de 100 amostras de alimentos, incluindo leite cru, leite pasteurizado, coalhada, queijo, e 165 amostras ambientais, incluindo ar ambiente, superfícies de equipamentos, móveis, utensílios, embalagem de polietileno, drenos, pisos, paredes e luvas utilizadas pelos manipuladores, foi coletado durante a fabricação de cinco lotes diferentes, a intervalos de 45-50 dias, no período de maio a outubro de 2004. As amostras ambientais foram analisadas quanto à presença de *L. monocytogenes*, *Staphylococcus* spp., enquanto as amostras de alimentos, também, foram analisadas quanto ao número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais, pesquisa de *E. coli* e de *Salmonella* sp. A contagem e identificação das bactérias analisadas foi realizada pelos métodos preconizados pelo *Bacteriological Analytical Manual* (FDA), exceto para *L. monocytogenes* que foi analisada segundo metodologia do *Canadian Health and Food Branch*. Os isolados característicos do gênero *Listeria* foram identificados utilizando-se o kit *API[®] Listeria* e por meio da amplificação de fragmentos dos genes *hly* e *actA*, utilizando a técnica PCR. Cem isolados característicos de *Staphylococcus* sp. foram identificados pelo sistema *API - Staph* (*BioMérieux*) e os 23 isolados identificados como *S. aureus* foram confirmados através da amplificação de um fragmento do gene *femA* pela

técnica da PCR. A pesquisa dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sei* e *sej* foi realizada em 32 cepas de *Staphylococcus*, utilizando PCR. A detecção de enterotoxinas foi realizada em 20 amostras compostas, através do método imunoenzimático ELFA empregando o sistema automatizado VIDAS® *Staph enterotoxin* II (BioMérieux). O leite cru apresentou elevada população de bactérias do grupo coliformes totais e fecais, com confirmação da presença de *E. coli*, evidenciando deficiências nas condições higiênico-sanitárias durante o processo de obtenção do leite. A presença de *E. coli* não foi constatada no leite pasteurizado, na coalhada e no queijo. Os níveis de coliformes totais e fecais detectados apresentaram-se superiores ao limite legal estabelecido para queijo de coalho (1.0×10^3 NMP/g) em apenas um lote. Em 100% das amostras dos alimentos analisadas verificou-se ausência de *Salmonella* spp. A avaliação de 18 isolados característicos do gênero *Listeria* através do kit API® *Listeria* revelou três isolados de *L. monocytogenes* “atípicas”, que não foram confirmadas, uma vez que não apresentaram amplificação dos fragmentos específicos para os genes *hly* e *actA*, indicando assim a possível ausência desse patógeno no ambiente de produção de queijo de coalho. A população de *Staphylococcus* sp. e de *Staphylococcus* coagulase positiva reduziram de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL e $5,0 \times 10^6$ UFC/mL no leite cru para zero e no leite pasteurizado, respectivamente. *Staphylococcus* coagulase positiva foi detectado em 100% das amostras de leite cru (25/25) e em 8% das amostras de queijos (2/25). As contagens de *Staphylococcus* sp. em equipamentos e utensílios oscilaram entre $<10^2$ a $3,2 \times 10^4$ UFC/cm². Identificou-se 12 espécies de *Staphylococcus* através do kit API® Staph, sendo nove coagulase negativa e três coagulase positiva. No leite cru observou-se alta frequência de espécies coagulase positiva, com prevalência de *S. aureus*. Nas demais amostras de produtos, luvas dos manipuladores, superfícies de equipamentos e utensílios a prevalência foi de espécies coagulase negativa. A presença de enterotoxinas estafilocócicas foi constatada em todas as amostras de um mesmo lote processado, desde a matéria prima até o produto final (queijo). De um total de 23 cepas de *S. aureus* identificados fenotipicamente

(*API[®] Staph* - *BioMérieux*), 82,6% (19/23) foram positivas para o gene *femA*, demonstrando maior especificidade e poder discriminatório da análise molecular. A presença dos genes *sea* e *sec* foi detectada em 37,5% (12/32) das cepas analisadas, sendo estas pertencentes a cinco espécies de *Staphylococcus*.

Palavras-chave: produtos lácteos, patógenos, enterotoxinas estafilocócicas, PCR

GENERAL SUMMARY

Cheese is considered to be a frequent vehicle of food borne pathogens, especially fresh artisan cheeses. Amongst these, “coalho” cheeses stand out since they are frequently made from non-pasteurised milk, under unsatisfactory conditions of hygiene, in small-scale industries that fail to completely adopt the Good Manufacturing Practices (GMP). Thus the microbiological contamination of this product assumes prominent relevance with respect to public health, due to the risk of transmitting foodborne diseases. In this study a diagnosis for the contamination by faecal coliforms, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp. and *Staphylococcus* spp. was carried out on the “coalho” cheese production line of a dairy in the metropolitan region of Fortaleza – CE, Brazil. A total of 100 samples were taken from 5 different batches processed at intervals of 45-50 days from May to October, 2004, and comprised non-pasteurised and pasteurised milks, curd, cheese and 145 environmental samples, including the air, equipment and utensils surfaces, drains, floors, walls and gloves worn by cheese handlers. The environmental samples were analysed for the presence of *L. monocytogenes* and *Staphylococcus* spp., whilst the food samples were also analysed for the most probable number (MPN) of total and faecal coliforms and examined for the presence of *E. coli* and *Salmonella* spp. The isolation and counts of the microorganisms analysed were carried out using the methods presented in the Bacteriological Analytical Manual (FDA), except for *L. monocytogenes*, which was analysed according to the Canadian Health and Food Branch methodology. Isolates characteristic of the genus *Listeria* were identified using the *API*[®] Listeria kit and by amplifying fragments of the genes *hly* and *actA* using the PCR technique. A hundred isolates characteristic of *Staphylococcus* sp., were selected for identification by the *API*[®] - *Staph* system (BioMérieux). Twenty-three *S. aureus* strains were identified at the molecular level by amplifying a fragment of the gene *femA*. A search for the genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sei* and *sej* was carried out by PCR in 32 strains of *Staphylococcus*. Enterotoxin detection was carried out for 20 compound samples using the ELFA immuno-enzymatic assay with the automatated *VIDAS*[®] *Staph*

enterotoxin II (BioMérieux). The non-pasteurised milk presented a high count of the total and faecal coliform group with confirmation of the presence of *E. coli*, as evidence of deficiencies in the hygiene-sanitary conditions during milking. *E. coli* was not found in the pasteurised milk, curd or cheese, and the levels of total and faecal coliforms found were above the legal limits for “coalho” cheese (10^3 MPN/mL) for one single batch. *Salmonella* spp. were absent in 100% of the samples analysed. Eighteen isolates characteristic of the genus *Listeria* were evaluated using the *API*[®] *Listeria* kit, and three “atypical” isolates of *L. monocytogenes* were found. These did not present amplification of the fragments specific for the genes *hly* and *actA*, raising the possibility of their absence in the “coalho” cheese production environment. The *Staphylococcus* sp. population decreased from 1.5×10^7 CFU/mL in the raw milk to zero in the pasteurised milk, whilst coagulase positive *Staphylococcus* decreased from 5.0×10^6 CFU/mL in the raw milk to zero in the pasteurised milk. Coagulase positive *Staphylococcus* was detected in 100% of the raw milk samples (25/25) and in 8% of the cheese samples (2/25). *Staphylococcus* sp. counts oscillated between $<10^2$ and 3.2×10^4 CFU/cm² on the equipment and utensils. Both coagulase positive and negative *Staphylococcus* species were identified on the gloves of the cheese handlers. Twelve species of *Staphylococcus* were identified, 9 being coagulase negative and 3 being coagulase positive. A high frequency of coagulase positive species was observed in the raw milk, with prevalence for *S. aureus*. The prevalence of coagulase negative species was verified in the other samples of product, handlers’ gloves, equipment and utensils surfaces. Staphylococcal enterotoxins were found in all the samples from one particular batch, from the raw material to the final product (cheese). Out of a total of 23 strains of *S. aureus* phenotypically identified (*API*[®] *Staph* – BioMérieux), 82.6% (19/23) were positive for the gene *femA*, demonstrating the greater specificity and discriminatory power of the molecular analysis. The presence of the genes *sea* and *sec* was detected at a level of 37.5% (12/32) of the strains analysed of 5 *Staphylococcus* species.

Key words: dairy products, pathogens, staphylococcal enterotoxins, PCR

INTRODUÇÃO GERAL

A produção de queijo de coalho na região Nordeste é expressiva para a economia regional, por se tratar de um produto de grande aceitação pela população e ser considerada fonte de renda e de trabalho para parcela considerável de pequenos e médios produtores rurais (NASSU *et al.*, 2001; CAVALCANTE *et al.*, 2004). Além disso, desempenha importante papel no desenvolvimento da agricultura familiar em pequenos municípios localizados nas bacias leiteiras. Esse tipo de queijo é fabricado em todos estados do Nordeste, mas a maior produção concentra-se nos estados de Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba.

A indústria queijeira na região Nordeste divide-se, basicamente, em pequenas unidades artesanais, sem qualquer fiscalização, e médias empresas, regulamentadas e inspecionadas pelo Ministério da Agricultura e órgãos oficiais estaduais e municipais. Contudo, a origem do queijo de coalho está, tradicionalmente, ligada à fabricação artesanal, fato que ainda persiste, em numerosas unidades de produção caseira e de fazendas produtoras localizadas, principalmente, no meio rural.

O queijo de coalho industrial é fabricado a partir de leite pasteurizado, com ou sem adição de culturas lácticas, pode ser maturado ou não e, geralmente, são armazenados e comercializados sob temperatura de refrigeração em supermercados, padarias e outros estabelecimentos especializados em venda de alimentos. Por ser produzido a partir de leite pasteurizado oferece maior segurança microbiológica, mas apresenta alterações nas características sensoriais quando comparado com o artesanal.

O queijo é considerado um veículo freqüente de patógenos de origem alimentar e, em especial os queijos frescos artesanais como o queijo de coalho por ser, na maioria das vezes, elaborado a partir de leite cru e sob condições

insatisfatórias de higiene. Portanto, a contaminação microbiológica desse produto assume destacada relevância tanto para os produtores, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (DTA).

Vários estudos têm classificado o queijo de coalho, principalmente o artesanal, como impróprio para o consumo humano devido ao elevado nível de contaminação por bactérias patogênicas (BORGES *et al.*, 2003; FEITOSA *et al.*, 2003, BRUNO *et al.*, 2005). Dentre estas, destacam-se coliformes fecais, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva.

A literatura faz referência a inúmeros relatos de surtos e casos esporádicos de DTA atribuída ao consumo de queijos contaminados por *S. aureus*, *Salmonella* e *L. monocytogenes*. No Ceará, o Núcleo de Epidemiologia da Secretária de Saúde do Estado do Ceará notificou um surto de intoxicação estafilocócica (CEARÁ, 2004) atribuído ao consumo de queijo. No Brasil, surto e caso esporádico de listeriose causados por alimentos ainda não foram descritos, embora a ocorrência de *L. monocytogenes* tenha sido relatada em vários tipos de queijos.

A alta incidência de patógenos, como *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva, constatada em queijo de coalho pode constituir um risco à saúde do consumidor, pela possibilidade de provocar surtos e casos esporádicos de doenças, como gastroenterites, listeriose, salmonelose e intoxicação estafilocócica.

As vias de contaminação de queijos podem ser o leite, o manipulador e o ambiente de processamento. No leite cru a principal fonte de contaminação provem da mastite bovina, na qual *S. aureus* é o principal agente etiológico. Os estudos realizados nas indústrias revelam que a contaminação cruzada após a

pasteurização do leite seria a fonte importante de contaminação dos queijos por patógenos.

Os métodos de caracterização molecular, como os baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese em gel de campo pulsante (PFGE) e a ribotipagem, têm se constituído em ferramentas importantes nas investigações epidemiológicas. Esses métodos permitem avaliar e elucidar surtos de DTA, diagnosticar a contaminação microbiana nas indústrias de alimentos e caracterizar o potencial patogênico de cepas isoladas de alimentos e do ambiente de processamento.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de contaminação por coliformes fecais, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa em uma linha de produção de queijo de coalho; avaliar a ocorrência de enterotoxinas estafilocócicas na matéria prima até o produto final; identificar isolados de *S. aureus* e de *L. monocytogenes* através da amplificação de fragmentos dos genes *femA*, *hly* e *actA*, respectivamente; avaliar o potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus* spp., através da detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas, utilizando a técnica PCR.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Revisão Bibliográfica

1. QUEIJO DE COALHO

1.1. Importância e Características do Queijo de Coalho

Com o desenvolvimento tecnológico da produção de queijo surgiram muitas variedades, sendo algumas de expressão regional, como os queijos artesanais queijo de “coalho” e queijo de “manteiga” produzidos no Nordeste (NASSU *et al.*, 2001) “serro, canastra, Minas, Araxá e Salitre” produzidos em Minas Gerais, no Sudeste (PINTO, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2004) e “colonial” produzido, principalmente, em Santa Catarina e Rio Grande do Sul, no Sul (IDE; BENEDET, 2001).

A produção de produtos lácteos como queijo de manteiga, manteiga da terra e, em especial, o queijo de coalho, na região Nordeste, representa uma atividade relevante para a economia regional, por ser considerada fonte de renda e de trabalho para parcela considerável de pequenos e médios produtores rurais (ESCOBAR *et al.*, 2001; CAVALCANTE; ANDRADE; SILVA, 2004). Além disso, desempenha importante papel no desenvolvimento da agricultura familiar, em pequenos municípios localizados nas bacias leiteiras. Esses produtos são fabricados em todos estados do Nordeste, mas a maior produção concentra-se nos estados do Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba.

A indústria queijeira na região Nordeste divide-se, basicamente, em pequenas unidades artesanais, sem qualquer fiscalização, e em médias empresas, indústrias regulamentadas e inspecionadas pelo Ministério da Agricultura ou órgãos oficiais estaduais e municipais.

Tradicionalmente, a origem do queijo de coalho está ligada à fabricação artesanal, fato que ainda persiste em numerosas unidades de produção caseira e de fazendas produtoras, as quais não contam com tecnologia apropriada de

manufatura e elaboram o queijo a partir de leite cru (NASSU *et al.*, 2001). Os queijos, em sua maioria, são armazenados e comercializados à temperatura ambiente em mercados, mercearias, padarias, feiras livres e outros estabelecimentos de vendas de alimentos.

De acordo com o Regulamento Técnico de identidade e Qualidade de Queijo de Coalho (SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA, 2001) o queijo de coalho industrializado deve ser fabricado a partir de leite pasteurizado, com ou sem adição de culturas lácticas, e pode ser maturado ou não. Por produzido a partir de leite pasteurizado apresenta maior segurança microbiológica e padronização da qualidade. Geralmente, são armazenados e comercializados sob temperatura de refrigeração em supermercados, padarias e outros estabelecimentos especializados em venda de alimentos. Além disso, sua fabricação não é realizada de forma exclusiva nas indústrias regulamentadas e fiscalizadas por órgãos oficiais, nas quais também são manufaturados queijos padronizados como Minas frescal, prato e mussarela, cujo volume de produção supera a do queijo de coalho (NASSU *et al.*, 2001).

Em relação à produção de queijo de coalho no Nordeste, constata-se escassez de dados estatísticos confiáveis, pelo fato da maior parte da sua produção ser artesanal e a comercialização ocorrer na informalidade, não sendo, portanto, incluída em estatísticas oficiais. Em levantamento realizado no Estado do Ceará, sobre o processamento do queijo de coalho em 57 unidades produtoras, constatou-se que 85% das unidades utilizavam leite cru e que apenas as quatro indústrias, submetidas à inspeção (Federal - SIF, Estadual - SIE e Municipal), pasteurizavam o leite utilizado na fabricação dos queijos (NASSU *et al.*, 2001).

O queijo de coalho é consumido diretamente, grelhado em frigideira, chapa ou grelhado na brasa na forma de espetinho, principalmente nas praias, além de ser ingrediente em vários pratos típicos da Região, como baião-de-dois, feijão de corda, tapioca, entre outros.

O queijo de coalho, devido a suas características de consumo e sabor peculiar, vem a cada dia ganhando novos consumidores em outras regiões do país, principalmente a Sudeste. Hoje, o queijo de coalho industrializado representa parte do mercado de queijos no Rio de Janeiro, São Paulo, Goiânia e Brasília (CAVALCANTE, 2005). No período de entressafra na produção de leite no Nordeste, queijo de coalho industrializado produzido em Minas Gerais tem sido comercializado nos estados da Bahia e Pernambuco. Em Campinas - SP foi identificada a comercialização de sete marcas de queijo de coalho industrializado produzidas em vários estados, sendo duas em Minas Gerais, duas no Paraná, uma no Mato Grosso, uma em Goiás e uma em Mato Grosso do Sul (PEREZ, 2005).

1.2. Processamento do Queijo de Coalho

A Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério da Agricultura, com base no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho (SDA, 2001), define queijo de coalho como o produto obtido da coagulação do leite pasteurizado através do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 dias de fabricação. É classificado como queijo de médio a alto teor de umidade, de massa cozida ou semicozida, apresentando um teor de gordura nos sólidos totais entre 35 e 60%. Quanto aos aspectos sensoriais, apresenta consistência semidura e elástica com textura compacta e macia. As principais características distintivas do processo de elaboração são: coagulação em torno de 40 minutos, corte e mexedura da massa, remoção parcial do soro, aquecimento da massa com água quente ou vapor indireto até obtenção de massa semicozida (até 45°C) ou cozida (entre 45 e 55°C), adição de sal (cloreto de sódio) a massa, prensagem, secagem, embalagem e estocagem a 10-12°C, normalmente até 10 dias. Este queijo, também poderá ser elaborado a partir de massa crua, ou seja, sem aquecimento.

2. MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS DE IMPORTÂNCIA EM QUEIJOS

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são responsáveis, atualmente, pela maior parte dos surtos de diarreia em quase todos países do mundo. O desenvolvimento econômico e a globalização da comercialização de alimentos e as mudanças nos hábitos alimentares, aliados ao crescente consumo de alimentos industrializados preparados fora de casa, alteram o perfil epidemiológico dessas doenças.

As DTA são associadas, principalmente, ao consumo de produtos de origem animal, em especial os produtos lácteos. Em surtos e casos esporádicos de DTA, as bactérias patogênicas têm sido identificadas apenas em 30%, mas respondem por 60% dos casos de hospitalização e 70% dos casos fatais (MEAD *et al.*, 1999). A incidência global de DTA é reconhecidamente subnotificada, tornando-se impossível avaliar seu real impacto na saúde das populações e na economia dos países, mesmo os desenvolvidos (FLINT *et al.*, 2005). O impacto das DTA nos países em desenvolvimento é difícil de calcular, mas estima-se que nestes países ocorrem anualmente 2,1 milhões de mortes, principalmente crianças com até cinco anos de idade, devido à diarreia, veiculada, na maioria das vezes, pela água e pelos alimentos. Nos países industrializados, a mortalidade é limitada, mas a incidência de surtos (30%) permanece alta (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Nos países da União Européia, estima-se que ocorram, anualmente, 45,4 milhões de casos esporádicos e surtos de DTA (CASHELL, 2004). A salmonelose tem sido a doença relatada com maior frequência, seguida da campilobacteriose (FOOD ADMINISTRATION ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Casos de listeriose são relatados por poucos países, mas a incidência é alta em países em que a notificação é obrigatória (FAO/WHO, 2002; HAEGHEBAERT *et al.*, 2003). No período de 1993 a 1998, foram investigados mais de 30.000 surtos, com acometimento de 391.383 pessoas, em 42 países

participantes do Programa de Vigilância da WHO para Controle de DTA na Europa. *Salmonella* spp. foi identificada em 77,1% dos casos, com predominância de *S. Enteritidis* (35%), *Staphylococcus aureus* em 4%, entre outros patógenos. Leite e produtos lácteos representaram 8% dos alimentos envolvidos (FAO/WHO, 2002).

Nos Estados Unidos, a incidência de DTA permanece alta, apesar do substancial declínio observado na incidência de alguns patógenos específicos (*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*) no período entre 1996 a 2004 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003a; CDC, 2004). A rede de vigilância de alimentos (*FoodNet*) diagnosticou, em 2004, 15.806 casos de doenças atribuídas ao consumo de alimentos. Entre os 10 patógenos rastreados, constatou-se a prevalência de *Salmonella* em 41% dos casos, *Campylobacter* em 36%, *Shigella* em 14%, *E. coli* STEC O157 em 2,5% e *Listeria* em 0,8% (CDC, 2004). Embora, *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 tenham apresentado redução em sua incidência, a porcentagem de pessoas hospitalizadas foi muito alta, 91% para *Listeria* e 39% para *E. coli* O157 (CDC, 2003a).

No Brasil, no período de 1999 a 2004, foram notificados 3.064 surtos, com o acometimento de 57.353 pessoas e registro de 37 mortes. As Secretarias Estaduais de Saúde dos estados das regiões Sudeste e Sul foram as que mais contribuíram com notificação de surtos, em função do nível mais avançado de implantação do sistema de Vigilância Epidemiológica das DTA nas Secretarias de Vigilância em Saúde nestas regiões. Alimentos preparados com ovos e maionese predominaram, com 22,2% dos casos, seguidos por alimentos com preparações mistas (21,5%); carnes vermelhas (13,8%); sobremesas (12,1%) e água (7,2%). Houve identificação etiológica em 1.882 surtos e a *Salmonella* foi identificada em 41% (772/1882) dos surtos, seguida pelo *Staphylococcus aureus* (18,1%) e outros agentes (CARMO *et al.*, 2005).

2.1. Grupo Coliforme Fecal e *E. coli*

2.1.1. Características dos coliformes fecais e *E. coli*

Coliformes fecais, também denominados de coliformes termotolerantes por crescerem em temperatura elevada ($\pm 45^{\circ}\text{C}$), não é uma classificação taxonômica, mas incluem um grupo de bactérias em forma de bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporogênicos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas de incubação a $45,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, para todos os alimentos, exceto para análise de água, pescados e moluscos, nos quais a temperatura de incubação é de $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ °C (FENG; WEAGANT, 2002).

O grupo coliforme fecal consiste principalmente de espécies de *E. coli* pertencente ao gênero *Escherichia*, membro da família *Enterobacteriaceae* (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004). *E.coli* é a espécie predominante entre as diversas bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, que fazem parte da microbiota do trato intestinal do homem e dos animais de sangue quente. Esta bactéria ainda é encontrada na água, no solo, nos vegetais e alimentos, principalmente nos de origem animal como o leite e produtos lácteos. Sua ocorrência em alimentos é avaliada sob dois aspectos: (1) Por ser uma enterobactéria, sua presença no alimento indica uma contaminação de origem fecal, portanto, produzido em condições higiênicas insatisfatórias; (2) O outro aspecto a ser considerado é que algumas cepas são patogênicas para o homem e animais e causam, principalmente, diarreias (FENG; WEAGANT, 2002). Com base nos fatores de virulência, distintos sorotipos O:H, mecanismos de patogenicidade (interação com a mucosa intestinal), manifestações clínicas e epidemiologia as cepas patogênicas de *E. coli* são divididas em seis grupos: (1) *E. coli* enteropatogênica (EPEC), (2) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), (3) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), (4) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), (5) *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC) e (6) *E. coli* difusamente adesiva (*diffusely adherent E. coli*) (NATARO; KAPER, 1998; MENG *et al.*, 2001; BOPP *et al.*, 2003; CLARKE *et*

al., 2003). Basicamente, apenas os quatros primeiros grupos de *E. coli* têm sido relacionados com surtos de DTA, sendo *E. coli* enteropatogênica (EPEC), o principal agente etiológico nas diarreias infantis.

2.1.2. Incidência de coliformes fecais e surtos de *E. coli* associados ao consumo de leite e produtos lácteos

A ocorrência de coliformes fecais e *E. coli* em queijos produzidos a partir de leite pasteurizado ou não tem sido relatada em muitos países. *E. coli* foi o agente etiológico em 11 surtos atribuídos ao consumo de leite e queijos, ocorridos na França e outros países industrializados, no período de 1988 a 1997 (DE BUYSER *et al.*, 2001). Neste mesmo período, os autores também verificaram que o leite e produtos lácteos foram implicados em 5% (3.839) dos surtos de origem bacteriana ocorridos na França.

No Brasil, coliformes fecais e *E. coli* são detectados com frequência em vários tipos de queijos. Pereira e outros (1999) avaliaram 20 amostras de queijo Minas frescal, 100 de queijo Minas padrão e 48 de queijo canastra e constataram que 90% do queijo Minas frescal, 52% do queijo Minas padrão e 81,2% do canastra continham níveis de coliformes fecais, superiores aos limites estabelecidos na legislação vigente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001). Carvalho (2003) também constatou contagens de coliformes fecais acima do limite permitido pela legislação em 34,4% (93) das amostras de queijo Minas frescal analisadas. Em outro estudo, Reibnitz e García (1998) constataram a presença de coliformes fecais e *E. coli* em 70% (20) das amostras de queijo colonial artesanal, comercializados em Blumenau – SC.

Em queijo de coalho, a ocorrência de coliformes fecais em níveis superiores aos permitidos pela legislação também tem sido relatada em vários estudos. No Ceará, Borges e outros (2003) avaliaram 43 amostras de queijo de coalho, produzidos em 11 municípios pertencentes a cinco microrregiões produtoras de

leite e verificaram que 74% das amostras estavam contaminadas por coliformes fecais e *E. coli* em níveis superiores ao estabelecido na legislação. Em outro estudo, Bruno e outros (2005) verificaram que 100% (8) das amostras de queijo de coalho analisadas apresentavam níveis de coliformes fecais e *E. coli* em desacordo com os padrões microbiológicos vigentes. No Rio Grande do Norte, Feitosa e outros (2003) detectaram coliformes fecais acima dos limites legais em 36% (4/11) das amostras de queijo de coalho, produzido em diferentes microrregiões do Estado. Em pesquisa semelhante Paiva e Cardonha (1999) constataram que 60% (18/30) das amostras de queijo coalho artesanal, comercializadas no Estado também apresentavam níveis de coliformes fecais em desacordo com a legislação. Em Pernambuco, Mendes e outros (1999) constataram elevadas contagens de coliformes fecais, acima dos limites legais, em 100% (105) das amostras de queijo de coalho comercializados em Recife, procedentes de 15 municípios.

2.2. *Listeria monocytogenes*

2.2.1. Características taxonômicas e bioquímicas do gênero *Listeria*

Segundo o *Taxonomic outline of the prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004), o gênero *Listeria* encontra-se classificado na classe *Bacilli*, Ordem I *Bacillales* e família IV *Listeriaceae* e apresenta seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. weishimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi*.

As espécies do gênero são pequenos bastonetes Gram positivos, não formam esporos, não formam cápsula, anaeróbios facultativos, móveis devido a flagelos peritríquios e em meio-sólido, a 20-25°C, apresentam motilidade típica de guarda-chuva (BILLE; ROCOURT, 2003). Crescem numa faixa de temperatura entre -0,4 a 50°C (LOU; YOUSEF, 1999), com crescimento ótimo a 30-37°C (BILLE; ROCOURT, 2003). A faixa de pH para crescimento situa-se entre 5,6 a 9,6

(SWAMINATHAN, 2001), mas o crescimento de *L. monocytogenes* já foi constatado em pH abaixo de 4,0 (LOU; YOUSEF, 1999; DONELLY, 2001). A atividade de água ótima é >0,97, porém, a mínima varia entre 0,90-0,93 (LOU; YOUSEF, 1999) e toleram altas concentrações de cloreto de sódio (10-12%), sobrevivendo a 25,5% de NaCl (DONELLY, 2001).

2.2.2. Listeriose

A listeriose é uma doença causada pela ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes*. São descritas duas formas de manifestação clínica da doença, a listeriose invasiva e a listeriose gastrointestinal (não invasiva). A listeriose invasiva é uma doença severa, pois a taxa de mortalidade é alta (20 a 30%), principalmente para pessoas susceptíveis a adquirir a infecção, como gestantes, recém nascidos, idosos, pacientes submetidos a hemodiálise e a terapias prolongadas, indivíduos com sistema imunológico deprimido (SWAMINATHAN, 2001), enquanto a listeriose não invasiva pode causar infecções suaves semelhantes a uma gripe, em indivíduos saudáveis, até surtos de gastroenterite febril, mas normalmente não evolui para óbito (CARRIQUE-MAS *et al.*, 2003; GAHAN; HILL, 2005).

O período de incubação da listeriose varia de horas a semanas (MAKINO *et al.*, 2005), sendo que a dose infectante de *L. monocytogenes* para causar a doença ainda não está bem definida. A dose aproximada, relatada de casos, varia de 10^3 a 10^9 UFC/g ou mL (DALTON *et al.*, 1997), mas há relatos de surtos com contaminação extremamente baixa (<0,3UFC/g) (MEAD *et al.*, 1999). A dose infecciosa também varia em função da virulência da cepa e da suscetibilidade do indivíduo (SWAMINATHAN, 2001). Os sintomas mais comuns são febre, fadiga, mal-estar, podendo haver ou não presença de náusea, vômito, dores e diarreia. Em casos mais graves, ocorre meningite, meningoencefalite, encefalite, septicemia. Em indivíduos saudáveis, a doença é pouco freqüente e manifesta-se

como gastroenterite caracterizada por febre, vômitos, dor abdominal e diarreia (DONELLY, 2001).

2.2.3. Patogenicidade e genes de virulência de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes é um patógeno intracelular com habilidade de penetrar, multiplicar-se dentro do citoplasma da célula do hospedeiro (macrófagos, fibroblasto, eritrócitos) e invadir células adjacentes, além de se proteger do sistema imunológico do hospedeiro (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). Inicialmente, o processo infeccioso parece ser uma associação com a membrana plasmática das células epiteliais das microvilosidades do trato intestinal do hospedeiro. Então, a célula bacteriana é internalizada pela célula por fagocitose, permanece no vacúolo por curto período de tempo e quando ocorre a lise da membrana fagossomal é liberada no citoplasma da célula do hospedeiro, onde se multiplica rapidamente e induz a polimerização de filamentos de actina da célula do hospedeiro, formando longas caudas em uma das extremidades da célula bacteriana. Os filamentos de actina favorecem o deslocamento da bactéria no citoplasma, permitindo a invasão das células adjacentes dando início a um novo ciclo da infecção (SWAMINATHAN, 2001; VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; SCHMIDT; HENSEL, 2004).

Este processo infeccioso requer a produção e ação de várias proteínas da bactéria sobre os componentes da célula hospedeira, para realizar seu ciclo de vida intracelular. As proteínas envolvidas em cada etapa da fisiologia celular da infecção são codificadas por genes de virulência específicos. A maioria dos genes conhecidos no ciclo de reprodução de *L. monocytogenes* agrupa-se num *operon* que compreende em seis genes bem caracterizados, *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* e *plcB*, e mais três estruturas denominadas de x, y e z de função ainda desconhecida e localizadas numa das extremidades, após o gene *plcB*. Os seis genes codificam, respectivamente, as proteínas: PrfA (fator regulador positivo), PI-PLC (fosfatidilinositol fosfolipase C), LLO (listeriolisina O), Mpl (metaloprotease),

ActA (proteína envolvida na polimerização da actina) e PC-PLC (fosfolipase C). Os genes *inlA*, *inlB*, *inlC* que codificam, respectivamente, as proteínas internalina A (InlA), InlB e InlC, estão localizados fora desse operon, mas são regulados pelo ativador PrfA (KUHN; GOEBEL, 1999). O gene *iap*, que codifica a proteína p60 também, está localizado fora da cadeia e sua expressão não é dependente do ativador PrfA (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

A entrada de *L. monocytogenes* na célula do hospedeiro depende das proteínas de superfície InlA, necessária à entrada na célula intestinal, e InlB, mediadora na entrada em hepatócitos e células epiteliais ou fibroblastos. A proteína InlC é expressa, principalmente, na última fase da infecção, quando a bactéria encontra-se no ciclo intercelular ativo, sugerindo, portanto, seu envolvimento na disseminação da infecção (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). A proteína LLO (toxina) é o principal fator de virulência da bactéria e sua atividade hemolítica pode ser observada ao redor das colônias em meio ágar sangue (CHURCHILL; LEE; HALL, 2006). Sua ação parece mediar a lise do vacúolo (formação de poros) para tornar-se livre no citoplasma da célula (KUHN; GOEBEL, 1999; SWAMINATHAN, 2001). O fator PI-PLC, também pode estar envolvido neste processo (SWAMINATHAN, 2001). A proteína ActA é o principal fator envolvido na movimentação intercelular de *L. monocytogenes* no processo de infecção, cuja função específica é indução da polimerização da actina (KUHN; GOEBEL, 1999). Outros fatores de virulência, como as fosfolipases (PC-PLC e PI-PLC) têm ação importante no rompimento do vacúolo de membrana dupla, em que *L. monocytogenes* encontra-se envolvida após a entrada nas células adjacentes. A ação da PC-PLC parece que é essencial, mas a PI-PLC tem apenas papel secundário na virulência, porém atua sinergisticamente com a PC-PLC e a Mpl para atingir juntamente com a LLO o rompimento dos vacúolos no processo de infecção (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

2.2.4. Métodos de subtipagem de *L. monocytogenes* e sua aplicação

Os métodos de subtipagem bacteriana são ferramentas importantes nas investigações epidemiológicas, pois permitem elucidar surtos de DTA e auxiliam na adoção de medidas preventivas para controle do agente patogênico. Para a indústria de alimentos a grande contribuição dos métodos de subtipagem é a possibilidade de traçar a origem da contaminação do produto final, verificar a disseminação da contaminação e determinar os pontos de persistência de patógenos na linha de produção, visando à correção e adequação ou implantação de procedimentos operacionais de higienização mais adequados.

A subtipagem inclui métodos fenotípicos e métodos genotípicos. Os métodos fenotípicos baseiam-se na detecção de características expressas pelo microrganismo como a sorotipagem, biotipagem, fagotipagem, tipagem da susceptibilidade a antimicrobianos, tipagem das bacteriocinas e eletroforese de enzimas multilocos (GRAVES; SWAMINATHAN; HUNTER, 1999; FARBER *et al.*, 2001). Os métodos genotípicos mais utilizados são: tipagem plasmidial, análises de restrição do DNA cromossômico (*restriction endonucleases analysis - REA*), eletroforese em gel de campo pulsante (*pulsed-field gel electrophoresis - PFGE*) e os métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reactin - PCR*): DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (*randomly amplified polymorphic DNA - RAPD*), *PCR* – polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (*PCR – restriction fragment lenght polymorphism - PCR-RFLP*); ribotipagem, seqüenciamento de DNA, entre outros (FARBER *et al.*, 2001; RIJPENS; HERMAN, 2002; WIEDMANN, 2002; BORUCKI, *et al.*, 2004; GRAVES *et al.*, 2005).

A sorotipagem, a fagotipagem e a genotipagem têm sido os métodos mais utilizados na avaliação da incidência e de surtos de listeriose (ALMEIDA; ALMEIDA, 2000; SILVA *et al.*, 2001; GASANOV; HUGHES; HANSHRO, 2005). A genotipagem permite uma caracterização específica da espécie e é superior a

fenotipagem, pois fornece uma discriminação mais precisa das cepas de *L. monocytogenes*.

Os métodos de subtipagem têm sido utilizados na avaliação da contaminação microbiana na indústria de alimentos, em vários estudos (TOMPKIN, 2002; KELLES; GILMOUR, 2004, KABUKI, 2005). Na maioria dos estudos, sobre a disseminação, rastreamento e controle de *L. monocytogenes* em indústrias de alimentos, os métodos moleculares são os mais adotados (SILVA *et al.*, 2003; KABUKI *et al.*, 2004).

Através dos métodos de subtipagem pode ser verificado que algumas cepas de *L. monocytogenes* podem estabelecer-se no ambiente de processamento e aí permanecerem como flora residente por meses ou até anos. Na Suécia, uma cepa de *L. monocytogenes* sorotipo 3b persistiu durante sete anos em uma planta de processamento de queijo *blue veined*. Na Suíça, uma cepa sorotipo 4b permaneceu por 11 meses no ambiente de processamento de queijo de leite de cabra, enquanto outra cepa deste mesmo sorotipo persistiu durante quatro anos em uma planta de processamento de queijo no Reino Unido (TOMPKIN, 2002). Em outro estudo, Waak, Tham e Danielsson-Tham (2002) também relataram a persistência desta bactéria em tanques de leite das fazendas e silos de armazenamento de leite, em indústria de laticínios, na Suécia.

2.2.5. Ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos e indústrias de laticínios

A ocorrência de *L. monocytogenes* em leite e produtos lácteos tem sido relatada em muitos estudos (SILVA; HOFFER; TIBANA, 1998; CATÃO; CEBALLOS, 2001; KABUKI *et al.*, 2004). Entre os produtos lácteos, os queijos são os mais comumente contaminados por esta bactéria, principalmente os de alta e média umidade. A contaminação de queijos por *L. monocytogenes* está relacionada com a contaminação do leite cru, o que pode ocorrer durante o processo de ordenha, estocagem, transporte até a indústria e a partir do ambiente

do processamento (TOMPKIN, 2002; WAAK; THAM; DANIELSSON-THAM, 2002; KABUKI *et al.*, 2004).

As pesquisas sobre a incidência de *L. monocytogenes* apresentadas na **Tabela 1** revelam a prevalência desta bactéria em diferentes tipos de queijos em diversos países. Os dados mostram uma grande variação (zero a 50%) na prevalência do patógeno em queijos. As maiores taxas de ocorrência são observadas em queijo de coalho (SOUZA, 1999), queijo macio (PINTADO *et al.*, 2004) e frescos (SILVA; HOFFER; TIBANA, 1998). Ainda, evidencia que no Brasil o queijo de coalho e o queijo Minas frescal, são os mais estudados com relação à contaminação por *L. monocytogenes*.

Silva, Hoffer e Tibana (1998) observaram maior incidência de *L. monocytogenes* em queijo Minas frescal artesanal (7/17) elaborado a partir de leite cru em relação ao industrial produzido a partir de leite pasteurizado (1/17). Na Itália, Gianfranceschi e outros (2003) avaliaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos e no ambiente de processamento, no período de 1990 a 1999 e verificaram que a incidência desta bactéria em produtos lácteos foi de 17,4% (88/505).

Em queijo de coalho, a incidência de *L. monocytogenes* também apresenta ampla variação (zero a 50%), tanto para queijos artesanais como para industrializados. A maior taxa (50%) de ocorrência do patógeno foi observada em queijo artesanal comercializado em João Pessoa (SOUZA, 1999). Cabe ressaltar que, em outro estudo, Catão e Ceballos (2001) constataram alta incidência (51,5%) de *L. monocytogenes* em leite cru procedente de três municípios do estado da Paraíba. No Ceará, a maior ocorrência de *L. monocytogenes* (19%) foi constatada em queijo de coalho industrializado, armazenado sob refrigeração (BRANCO *et al.*, 2003). Já, em queijo artesanal elaborado a partir de leite cru a prevalência desta bactéria foi baixa (zero a 2,3%) (BORGES *et al.*, 2003; BRANCO *et al.*, 2003; BRUNO *et al.*, 2005).

Tabela 1. Incidência de *L. monocytogenes* em queijos em vários países.

Amostra	Nº amostras + / Total (%)	País	Referência
Queijo Minas frescal	7 / 17 (41,1)	Brasil	Silva <i>et al.</i> (1998)
Queijo macio	14 / 73 (19,0)	Dinamarca	Nørrung <i>et al.</i> (1999)
Queijo Panela	3 / 20 (15,0)	Estados Unidos	Saltijeral <i>et al.</i> (1999)
Queijo de coalho	15 / 30 (50,0)	Brasil	Sousa (1999)
Queijos macios e semimacios	23 / 374 (6,0)	Vários países da Europa	Rudolf; Scherer (2001)
Queijo macio	20 / 256 (0,8)	Chile	Cordano; Rocourt (2001)
Queijos	2 / 74 (2,7)	Bélgica	De Réu <i>et al.</i> (2002)
Queijo de coalho	1 / 17 (5,9)	Brasil	Leite <i>et al.</i> (2002)
Queijo de coalho	1 / 70 (1,4)	Brasil	Sousa (2002)
Queijo de coalho	1 / 43 (2,3)	Brasil	Borges <i>et al.</i> (2003)
Queijo de coalho	16 / 84 (19,0)	Brasil	Branco <i>et al.</i> (2003)
Queijo de coalho	0,0 / 11 (0,0)	Brasil	Feitosa <i>et al.</i> (2003)
Queijo tipo Hispânico	3 / 2931 (0,2)	Estados Unidos	Gombas <i>et al.</i> (2003)
Queijo de coalho	1 / 58 (1,7)	Brasil	Ramos; Costa (2003)
Queijo fresco	3 / 74 (4,0)	Peru	Espinoza <i>et al.</i> (2004)
Queijos (leite cru)	6 / 371 (1,6)	Portugal	Mena <i>et al.</i> (2004)
Queijo fresco	2 / 50 (4,0)	Portugal	Mena <i>et al.</i> (2004)
Queijo fresco	7 / 111 (6,3%)	Estados Unidos	Kabuki <i>et al.</i> (2004)
Queijo de coalho	0 / 8 (0,0)	Brasil	Bruno <i>et al.</i> (2005)
Queijo de coalho	7 / 127 (5,5)	Brasil	Duarte <i>et al.</i> (2005)
Queijo artesanal	15 / 123 (12,2)	Japão	Makino <i>et al.</i> (2005)
Queijo macio	29 / 63 (46,0)	Portugal	Pintado <i>et al.</i> (2004)
Queijo Gorgonzola	35 / 1656 (2,1)	Itália	Manfreda <i>et al.</i> (2005)
Ricota	3 / 45 (6,7%)	Brasil	Esper (2006)
Queijo Minas Frescal	3 / 93 (3,2)	Brasil	Carvalho (2003)
Queijo Tulum	12 / 250 (4,8%)	Turquia	Colak <i>et al.</i> (In press)

Considerando a importância de *L. monocytogenes* em produtos lácteos, a legislação brasileira (ANVISA, 2001), estabelece ausência deste patógeno em 25g de amostra, para queijos com média, alta e muito alta umidade, uma vez que sua

presença tem sido observada nesse tipo de produto (SILVA; HOFFER; TIBANA, 1998; SOUSA, 2002; BORGES *et al.*, 2003; BRANCO *et al.*, 2003; CARVALHO, 2003).

L. monocytogenes tem sido encontrada em várias plantas de processamento de alimentos (GRAVANI, 1999; TOMPKIN, 2002), em especial, as processadoras de produtos lácteos (SILVA *et al.*, 2003; KELLES; GILMOUR, 2004). Na indústria de laticínios, as principais vias de introdução deste patógeno são o leite cru, os utensílios e os equipamentos contaminados, o solo carregado pelas botas e roupas dos trabalhadores, mas pode ocorrer através do ar ou do sistema de ventilação, da água empoçada e/ou condensada e dos carros de transporte, além da possibilidade desta ser carregada por operários ou visitantes doentes (SWAMINATHAN, 2001).

A presença de *L. monocytogenes* tem sido constatada na linha de produção, no ambiente de processamento e no produto acabado, em vários estabelecimentos processadores de produtos lácteos. Vale ressaltar que algumas cepas de *L. monocytogenes* podem estabelecer-se no ambiente de processamento e aí permanecerem como flora residente durante meses ou até anos.

Em uma indústria beneficiadora de leite tipo C, em Fortaleza, *L. monocytogenes* foi detectada no leite cru fresco e refrigerado, leite pasteurizado (após 60 horas de estocagem a 4°C), tanque de recepção do leite cru, caixas plásticas de transporte de leite e em drenos e pisos (FIGUEIREDO, 2000). Em outra usina beneficiadora de leite tipo C, localizada em João Pessoa, foi verificada alta incidência de *L. monocytogenes*. Esta bactéria foi isolada em 61,9% (26/42) das amostras de leite (leite cru e leite pasteurizado). Mesmo após melhorias das condições de higienização da usina, a incidência de *Listeria* spp. foi reduzida de 66,6 para 11,1% (CATÃO; CEBALLOS, 2001). Na Bahia, Silva e outros (2003) observaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em 1% (2/218) das amostras

avaliadas em duas indústrias processadoras de queijo Minas frescal. A bactéria foi detectada no leite cru e no piso da sala de estocagem de leite em apenas uma das indústrias.

Nos Estados Unidos, Pritchard, Flanders e Donelly (1995) avaliaram 21 indústrias de laticínios e verificaram incidência de *L. monocytogenes* em 9,2% das amostras analisadas. A porcentagem de contaminação das amostras ambientais (49,7%) foi significativamente superior ao dos equipamentos (7%). A bactéria foi isolada em equipamentos tais como tanque de armazenamento, superfícies de bancadas, transportadora, pá para filagem da massa, envasadora, máquina para filtragem de salmoura, e em amostras do ambiente de processamento, como salas de resfriamento, congelamento, recebimento e estocagem do leite cru. Em outro estudo, Kabuki e outros (2004) realizaram um diagnóstico da contaminação por *L. monocytogenes* em três indústrias processadoras de queijos frescos tipo Hispânico, nos Estados Unidos, e constataram a presença desta bactéria em 6,3% dos queijos e 11% das amostras ambientais tais como superfícies de mesas, tubos de conexões de plástico, caixas vazadas, embalagem do leite, drenos e pisos.

Na Austrália, Sutherinad e Porrit (1996) relatam a presença de *L. monocytogenes* em indústrias de laticínios (queijo, leite, sorvete entre outros). A bactéria foi detectada em pisos, drenos, esteiras transportadoras e em superfícies de contato direto com os produtos. Em indústrias processadoras de queijos na Espanha, *L. monocytogenes* foi isolada no leite cru, prensa, pisos e drenos da sala de produção, prateleiras de madeira da sala de maturação, equipamento de embalagem (MENENDEZ *et al.*, 1997). No norte da Irlanda, Kells e Gilmour (2004) avaliaram duas plantas de processamento de leite e constataram ocorrência de *L. monocytogenes* em 22% das amostras de leite cru, em 6,0% dos equipamentos e em 41% das amostras do ambiente de processamento. Drenos e escadas de aço inoxidável foram considerados as principais fontes de contaminação por esta bactéria. No Japão, Makino e outros (2005) verificaram a presença de cepas de *L.*

monocytogenes sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b em várias amostras do ambiente de processamento, em uma unidade produtora de queijos. A contaminação foi constatada no tanque de resfriamento do leite, na sala de produção e cura, dreno e fezes de trabalhadores.

2.2.6. Surtos e casos de listeriose associados ao consumo de leite e produtos lácteos

A confirmação de vários casos esporádicos e surtos de listeriose ocorridos no Canadá, Estados Unidos e Europa (RYSER, 1999), na década de 80, associados ao consumo, principalmente, de queijos e de vegetais crus levou a inclusão de *L. monocytogenes* na lista de patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos. A partir dessa década, um grande número de surtos e casos de listeriose tem sido relatado na literatura, alguns relacionados a leite e produtos lácteos são apresentados na **Tabela 2**.

O consumo de queijo macio Vacherin Mont-d'Or produzido a partir de leite cru causou surtos de listeriose na Suíça entre 1983 a 1987. Neste período, ocorreram 122 casos da doença, com 33 mortes. No inverno era observado um aumento na ocorrência de listeriose. Os mesmos sorotipos (4b) e fagotipos de *L. monocytogenes* foram identificados em pacientes e no queijo (BÜLA; BILLE; GLAUSER, 1995).

Em 1983, um surto ocorrido nos Estados Unidos foi atribuído ao consumo de leite pasteurizado submetido a tratamento térmico inadequado. Na investigação, foram isolados vários sorotipos de *L. monocytogenes* nas amostras de leite cru. Casos de listeriose também foram constatados nas vacas leiteiras (FLEMING *et al.*, 1985). Outro surto ocorrido em Los Angeles, Califórnia, em 1985, foi associado ao consumo de queijo Jalisco tipo mexicano obtido, possivelmente, de leite submetido a tratamento térmico insuficiente ou recontaminado após a pasteurização pela adição de leite cru. *L. monocytogenes* sorotipo 4b foi isolado

tanto de pacientes como do queijo (LINNAN *et al.*, 1988). Na Carolina do Norte, entre 2000 e 2001, houve um surto de listeriose causado pelo consumo de queijo tipo Mexicano artesanal elaborado a partir de leite cru contaminado por *L. monocytogenes*, com 13 casos diagnosticados (MACDONALD *et al.*, 2005).

Tabela 2. Surtos e casos de listeriose associados ao consumo de leite e produtos lácteos.

Ano	País	Veículo	Nº morte / Caso	Referência
1983	Estados Unidos	Leite pasteurizado	14 / 49	Fleming <i>et al.</i> (1985)
1985	Estados Unidos	Queijo Jalisco	48 / 142	Linnan <i>et al.</i> (1988)
1989/1990	Dinamarca	Queijo azul	0 / 26	Jensen <i>et al.</i> (1994)
1994	Estados Unidos	Leite achocolatado	0 / 3	Dalton <i>et al.</i> (1997)
1995	França	Queijo Brie de Meaux	0 / 33	Jacquet <i>et al.</i> (1995)
1995	França	Queijo macio	11 / 37	Goulet <i>et al.</i> (1995)
1997	França	Queijo Pont l'Évêque	0 / 14	Jacquet <i>et al.</i> (1998)
1998/1999	Finlândia	Manteiga	4 / 80	Lyytikainen <i>et al.</i> (2000)
2000/2001	Estados Unidos	Queijo tipo Mexicano	0 / 13	MacDonald <i>et al.</i> (2005)
2001	Japão	Queijo	0 / 86	Makino <i>et al.</i> (2005)

Em 1995, houve um surto de listeriose na França com 37 casos, associado ao consumo de queijo tipo *Brie de Meaux*, fabricado a partir de leite cru (GOULET *et al.*, 1995). Em 1997, ocorreu outro surto similar neste mesmo país, causado pelo consumo de queijo macio elaborado a partir de leite cru. Quatorze casos foram diagnosticados e dois tipos de queijos macios manufaturados no mesmo estabelecimento foram associados ao surto (JACQUET *et al.*, 1998).

Na Dinamarca, no período de 1989 a 1990, foram diagnosticados um surto e 69 casos de listeriose, sendo 26 causados pelo mesmo fagotipo. Na

investigação epidemiológica, o surto foi associado a dois veículos, queijo com mofo azul ou queijo duro (*apud* LUNDÉN, AUTIO; KORKEALA, 2004). Entre 1998 e 1999, manteiga de leite pasteurizado foi veículo de um surto de *L. monocytogenes*, na Finlândia. As cepas de *L. monocytogenes* isoladas dos pacientes e de amostras de manteiga, dos equipamentos e do ambiente de processamento apresentaram o mesmo perfil eletroforético (LYYTIKÄINEN *et al.*, 2000).

Em 2001, houve um surto na Suécia, no qual 48 pessoas apresentaram gastroenterite após consumir produtos lácteos manufaturados em uma fazenda. As investigações epidemiológicas constataram que queijo fresco elaborado a partir de leite cru, contaminado por *L. monocytogenes*, foi o agente causador do surto. A genotipagem revelou que as cepas isoladas dos pacientes e dos produtos lácteos eram idênticas. Outros patógenos, como *E. coli* enteropatogênica e *Staphylococcus* coagulase positiva também foram isolados das amostras dos produtos (CARRIQUE-MAS *et al.*, 2003).

No Japão, em 2001, ocorreu um surto de listeriose não invasiva, com acometimento de 84 pessoas. *L. monocytogenes* sorotipo 1/2b foi isolada de amostras de queijo (tipo do Japão), do ambiente de processamento e de fezes dos pacientes. As investigações epidemiológicas e a genotipagem das cepas evidenciaram que o surto foi causado pelo consumo de queijo (MAKINO *et al.*, 2005). Em 2002, ocorreu um surto de listeriose no Canadá, no qual foram envolvidas 17 pessoas. As investigações epidemiológicas atribuíram o surto ao consumo de queijo maturado por 60 dias, produzido a partir de leite submetido a tratamento térmico insuficiente (GAULIN *et al.*, 2003).

No Brasil, surtos e casos esporádicos de listeriose causados por alimentos ainda não foram descritos, embora a ocorrência de *L. monocytogenes* tenha sido relatada em vários estudos.

2.3. *Salmonella* sp.

2.3.1. Características taxonômicas e bioquímicas do gênero *Salmonella*

Atualmente, o novo sistema de nomenclatura do gênero *Salmonella* inclui as espécies *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo que a espécie *S. enterica*, subdivide-se em seis subespécies (**Tabela 3**) (DE VOS; TRÜPER; TINDALL, 2002; TINDALL *et al.*, 2005). Até 2002, haviam sido descritos 2.541 sorovares de *Salmonella* spp., sendo 60% destes referentes à *S. enterica* subsp. *Enterica* (CDC, 2005).

Tabela 3. Espécies e subespécies do gênero *Salmonella*.

Espécies	Designação das subespécies
<i>Salmonella bongori</i>	
<i>Salmonella enterica</i>	
Subespécies	
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Enterica</i>	I
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Salamae</i>	II
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Arizonae</i>	IIIa
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Diarizonae</i>	IIIb
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Houtenae</i>	IV
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Indica</i>	VI

Fontes: De Vos, Trüper e Tindall (2002); Tindall e outros (2005) (Adaptada).

Salmonella spp. são bacilos retos, Gram negativos, não esporulados, anaeróbicos facultativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. *Salmonella* spp. são mesófilas com crescimento entre 30-40°C, mas alguns sorotipos são psicrotróficos, crescem em ampla faixa de pH (4,5 a 8,0), com ótimo entre 6,0 a 7,5. A atividade de água para crescimento varia de 0,93 a 0,96, mas podem sobreviver por longo período em alimentos com baixa atividade de água. São capazes de crescer em concentrações moderadas de cloreto de sódio, 3-5% (D'AOUST; MAURER; BAILEY, 2001; BOPP *et al.*, 2003).

2.3.2. Doenças causadas por *Salmonella* sp.

A salmonelose, geralmente, é causada pelo consumo de alimentos de origem animal contaminados por *Salmonella*, como aves, ovos, carnes, e leite e seus derivados, embora muitos outros alimentos, incluindo vegetais contaminados, têm sido implicados na transmissão da doença. Este patógeno ocorre desde a cadeia de produção primária de alimentos até o ambiente doméstico ou estabelecimentos e instituições de serviços de alimentação. *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são os sorotipos de maior importância na transmissão de salmonelose humana (D'AOUST; MAURER; BAILEY, 2001).

A dose infectante oscila entre $2,0 \times 10^1$ a $1,0 \times 10^6$ células por grama de alimento ingerido. Os sintomas e a severidade de uma salmonelose podem variar de branda a severa, dependendo do sorotipo de *Salmonella* envolvido, da idade e saúde do indivíduo, sendo que crianças com até cinco anos e pessoas com sistema imunológico comprometido são mais susceptíveis. A composição do alimento também pode afetar os sintomas da doença. Em alimentos com elevado teor de gordura, as células da bactéria ficam protegidas dentro dos glóbulos de gordura, não sendo afetadas pelas enzimas digestivas ou acidez gástrica. Nestes alimentos, doses infectantes de até 50 células por grama, podem ser suficientes para desencadear uma salmonelose. Entre alimentos com esta característica destaca-se o chocolate, envolvido em diversos surtos (WERBER *et al.*, 2005).

O período de incubação de uma salmonelose varia consideravelmente, mas em geral, ocorre entre 8 e 72 horas após invasão na mucosa intestinal. Os sintomas da infecção incluem náuseas, vômitos, dores abdominais e febre moderada. Às vezes, os sintomas são precedidos por dor de cabeça e calafrios. As fezes são líquidas, esverdeadas, fétidas, podendo conter sangue. Surgem prostração, debilidade muscular e sonolência. Alguns sorotipos de *Salmonella* não tifoide podem invadir a corrente sangüínea originando uma septicemia e, em casos mais extremos, pode evoluir para óbito, mas, geralmente, a taxa de

mortalidade é baixa. A infecção dura de 2 a 5 dias, mas as consequências crônicas, como artrite reativa pós-enterocolite, síndrome de Reiter e portador assintomático, podem continuar por semanas e até meses. A artrite reativa pode ocorrer em cerca de 2% dos casos (D'AOUST; MAURER; BAILEY, 2001; ZIPRIN; HUME, 2001).

2.3.3. Patogenicidade e fatores de virulência de *Salmonella* sp.

Salmonella apresenta simultaneamente múltiplos fatores de virulência durante uma salmonelose humana. A infecção se inicia na mucosa do intestino delgado e do cólon, onde as células atravessam a camada epitelial do intestino e se proliferam. As células bacterianas são fagocitadas pelos macrófagos, resultando em resposta inflamatória decorrente da hiperatividade do sistema retículoendotelial. Nos casos de enterocolites, a penetração de *Salmonella* fica limitada à lâmina própria do epitélio intestinal e a infecção fica restrita à mucosa intestinal. Raramente se observa septicemia ou infecção sistêmica (D'AOUST; MAURER; BAILEY, 2001; BOPP *et al.*, 2003). Alguns sorotipos de *Salmonella* apresentam grandes plasmídios (30 a 60 kDa) de virulência, que contêm genes relacionados à capacidade de multiplicação destes sorotipos dentro dos macrófagos. Estes plasmídios também são capazes de induzir a lise de macrófagos, com uma resposta inflamatória, e causar enterite no paciente (D'AOUST; MAURER; BAILEY, 2001).

Enterotoxinas causadoras de diarreias são supostos fatores de virulência de *Salmonella*. A liberação de toxinas (citotoxinas e enterotoxinas) dentro do citoplasma da célula intestinal do paciente resulta em acúmulo de fluído no lúmen intestinal e provoca diarreia. A enterotoxigenicidade é um fator de virulência fenotípico que prevalece em sorotipos de *Salmonella*, inclusive *S. Typhi*, e é expresso horas após o contato com a célula intestinal do paciente (D'AOUST; MAURER; BAILEY, 2001).

2.3.4. Incidência, ocorrência de casos esporádicos e surtos de salmonelose associados de leite e produtos lácteos

A salmonelose constitui um dos problemas mais importantes de saúde pública no mundo e, representa custos econômicos significativos para a sociedade, em muitos países. A ocorrência de *Salmonella* spp. em alimentos é mundial sendo, portanto, um dos principais agentes microbianos envolvidos em surtos de DTA (DALTON *et al.*, 2004; CDC, 2005; COLAK *et al.*, *in press*) e grande parte dos surtos está associada ao consumo de produtos de origem animal, como, aves, ovos, carnes, leite e produtos lácteos.

Em 2003, foi relatado pelo CDC um total de 15.774 casos confirmados de infecções causadas por patógenos veiculados por alimentos, em nove estados americanos. *Salmonella* foi o agente etiológico em 6.040 casos (38,3%), com prevalência dos sorotipos *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Newport* e *S. Heidelberg* (CDC, 2004). Na França, a incidência de salmonelose, em 2001, foi de 21 casos por 100.000 habitantes, com prevalência do sorotipo *S. Enteritidis* em 39% dos casos (HAEGHEBAERT *et al.*, 2003). Nos Estados Unidos, em 2004, a incidência de *Salmonella* foi de 12,1% por 100.000 habitantes, com prevalência dos sorotipos *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Newport* em 43% dos isolados (CDC, 2005).

Leite e queijos têm merecido destaque como veículo de *Salmonella*. Na Itália, Busani e outros (2005) avaliaram a prevalência de *Salmonella* em vários tipos de alimentos de origem animal e constataram a presença de *Salmonella* em 2,2% das amostras (1.576/71.643). O patógeno foi detectado em 1,1% das amostras de queijos. Na Turquia, Colak e outros (*in press*) analisaram 250 amostras de queijo Tulum, elaborado a partir de leite cru e, observaram prevalência de *Salmonella* spp. em 2,4% dos queijos. No Brasil, há vários relatos sobre a ocorrência de *Salmonella* spp. em queijos, principalmente em queijo de

coalho artesanal (NASSU *et al.*, 2001; RAPINI *et al.*, 2002; ARAÚJO *et al.*, 2004; ESCOBAR *et al.*, 2001).

No Ceará, Borges e outros (2003) detectaram a presença de *Salmonella* spp. em 34,9% (43) das amostras de queijo de coalho analisadas. Em outro estudo, Bruno e outros (2005) verificaram que esta bactéria estava presente em 12,5% (8) dos queijos industrializados. No Rio Grande do Norte, Feitosa e outros (2003) relataram a presença de *Salmonella* em 9% (11) dos queijos analisados, de diferentes microrregiões do Estado. Florentino e Martins (1999) observaram a presença do patógeno em 30% (40) das amostras de queijo artesanal produzido em várias regiões do Estado da Paraíba. Em Recife, Mendes e outros (1999) avaliaram 105 amostras de queijo de coalho, procedentes de 15 municípios de Pernambuco, e verificaram a presença de *Salmonella* em 73,3% dos queijos, enquanto Duarte e outros (2005) isolaram este patógeno em apenas 5,5% dos queijos (7/127) comercializados em 21 municípios do Estado.

Surtos de salmonelose atribuídos ao consumo de leite e produtos lácteos têm sido relatados em vários estudos (OLSEN *et al.*, 2000; OLSEN *et al.*, 2004; FAO/WHO, 2002; HERVEY *et al.*, 2003). Na **Tabela 4** são apresentados dados de ocorrência de surtos em vários países.

No período de 1973 a 1992, Headrick e outros (1998) constataram a ocorrência de 12 surtos de salmonelose associados ao consumo de leite cru, relatados pelo Centro de Prevenção de Controle de Doenças (*Center For Disease Control and Prevention - CDC*) dos Estados Unidos. Em outro estudo, El-Gazzar e Marth (1992) realizaram um levantamento sobre surtos de salmonelose em produtos lácteos nos Estados Unidos, no período de 1965 a 1981, e verificaram que a ocorrência de 13 surtos devido ao consumo de leite (cru e pasteurizado) e, um surto, causado por queijo Cheddar. Ainda neste mesmo país, no período de 1973 a 1992, foi relatado pelo CDC um total de 32 surtos associados ao consumo de queijos. Muitas pessoas foram hospitalizadas e houve 58 mortes. Onze surtos

foram causados por queijos manufaturados a partir de leite cru, ou leite submetido à pasteurização insuficiente (ALTEKRUSE *et al.*, 1998).

Tabela 4. Surto de salmonelose associados ao consumo de leite e produtos lácteos.

Ano	País	Veículo	Nº mortes / Casos	Referência
1994	Canadá	Queijo macio	0 / 82	Ellis <i>et al.</i> (1998)
1995	França	Queijo (leite cru)	0 / 25	Vaillant <i>et al.</i> (1996)
1997	Estados Unidos	Queijo tipo Mexicano (leite cru)	0 / 31	Cody <i>et al.</i> (1999)
1997	Estados Unidos	Queijo tipo Mexicano (leite cru)	0 / 54	Villar <i>et al.</i> (1999)
1998	Canadá	Queijo Cheddar	0 / 80	RATNAM <i>et al.</i> (1999)
2000	Estados Unidos	Leite pasteurizado (contaminado)	0 / 93	Olsen <i>et al.</i> (2004)
2000	Brasil	Rizoto com queijo	0 / ND	Nadvorny <i>et al.</i> (2004)
2001	Estados Unidos	Queijo tipo italiano	0 / 31	McCarthy <i>et al.</i> (2002)
2001	França	Queijo Cantal (leite cru)	0 / 119	Haeghebaert <i>et al.</i> (2003)
2002	Estados Unidos	Leite cru	0 / 62	CDC (2003b)
2004	Brasil	Sanduiche com tomate seco e queijo	0 / 55	Silva <i>et al.</i> (2004)

Olsen e outros (2000) verificaram a ocorrência de 2.751 surtos de doenças veiculadas por alimentos nos Estados Unidos, entre 1993 e 1997. Nestes surtos foram acometidas 86.058 pessoas. Alta porcentagem dos surtos (75%) e casos (86%) foi causada por bactérias patogênicas. *Salmonella* foi o agente etiológico em 13% dos surtos, 37,9% dos casos e 44,8% (13) das mortes. O sorotipo Enteritidis causou grande número de surtos, casos e mortes. A maioria dos surtos foi devida ao consumo de ovos. Apenas 14 surtos foram veiculados por leite e derivados.

Na Inglaterra e países de Gales, no período de 1983 a 1984, 32 surtos associados com o consumo de leite e produtos lácteos acometeram 714 pessoas, sendo 22 surtos causados por *Salmonella* (BARRETT, 1986). Na Austrália, entre 1995 a 2000, foram identificados 214 surtos de origem alimentar. *Salmonella* foi o agente etiológico mais freqüente nos surtos (35%) e causou 40% (20/50) das mortes (DALTON *et al.*, 2004). Em Rio Negro, na Argentina, foram descritos 39 surtos, com acometimento de 958 pessoas, entre 1993 e 2001. *Salmonella* foi o agente etiológico mais freqüente nos surtos (38%) e causou um grande número de casos (52%). Queijos foi veículo de 10 % dos casos (DI PIETRO *et al.*, 2004).

No período de 1993 a 1998, foram investigados mais de 30.000 surtos de DTA, envolvendo 391.383 casos em 42 países, incluídos no programa Vigilância da Organização Mundial de Saúde para Controle de Doenças de Origem Alimentar da Europa. O agente causal foi identificado em, aproximadamente, 23.538 dos surtos investigados. *Salmonella* spp. foi o agente causal mais freqüente (77,1%) nos surtos. O sorotipo *S. Enteritidis* foi confirmado em 35% dos surtos, o sorotipo *S. Typhimurium* em 3%; e outros sorotipos em 3% dos surtos. O sorotipo de *Salmonella* não foi especificado em 36,1% dos surtos. Leite e produtos lácteos foram veículos de *Salmonella* em 8% dos surtos (FAO/WHO, 2002).

No Brasil, Carmo e outros (2005) avaliaram o perfil epidemiológico dos surtos de DTA, no período de 1999 a 2004, e constataram notificação de 3.064 surtos, com o acometimento de 57.353 pessoas e registro de 37 mortes. *Salmonella* foi o agente etiológico mais freqüente nos surtos, sendo detectada em 41% dos casos com identificação etiológica.

2.4. *Staphylococcus* enterotoxigênicos coagulase positiva e negativa

2.4.1. Características do gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus*, segundo o manual *Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, é composto de 30

espécies e 20 subespécies (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004). Os membros deste gênero são cocos Gram positivos, quando visualizados ao microscópio ocorrem sozinhos, aos pares, tétrades, cadeias curtas (três ou quatro células) ou apresentam formação semelhante a um cacho de uva. As espécies são anaeróbias facultativas, exceto *S. saccharolyticus* e *S. aureus* subsp. *anaerobius*. São tipicamente encapsuladas ou com formação de cápsula limitada, usualmente catalase positiva, não apresentam motilidade e nem produzem esporos (BANNERMAN, 2003).

Staphylococcus são amplamente distribuídos na natureza, sendo o homem e os animais os principais reservatórios. Geralmente, são encontrados nos pêlos, na pele, boca, narinas, glândulas mamárias, trato respiratório e intestinal destes hospedeiros (BANNERMAN, 2003). Em geral, as espécies deste gênero têm uma relação benigna ou simbiótica com o hospedeiro, porém, por serem bactérias oportunistas, certas espécies são freqüentemente agentes etiológicos de várias infecções no homem e nos animais. A espécie *S. aureus* é a que está associada mais freqüentemente a doenças estafilocócicas, quer sejam de origem alimentar ou não. Estima-se que entre 30 a 50 % da população humana seja portadora desta bactéria (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). A cavidade nasal é o principal habitat de *Staphylococcus* no homem e, a partir deste foco atingem tanto a epiderme e como ferimentos, água, ar, solo, esgoto, plantas de processamento de alimentos, leite, e alimentos diversos.

S. aureus é uma bactéria mesófila, mas cresce em ampla faixa de temperatura (10-45°C) e de pH (4,2-9,3), tolera elevadas concentrações de cloreto de sódio (até 23%) e baixa atividade de água (0,83 a 0,86). No entanto, concentrações entre 12 a 13 % de NaCl e 0,87 a 0,93 de atividade de água parecem ser limitantes para produção de enterotoxinas (MARTIN; MYERS; LANDOLO, 2001; BANNERMAN, 2003).

2.4.2. Intoxicação estafilocócica

A intoxicação estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos contendo enterotoxinas produzida por *Staphylococcus* enterotoxigênicos, como *S. aureus* (com maior prevalência), *S. hyicus*, *S. intermedius*, entre outras espécies. Esta intoxicação é um dos tipos mais comuns de DTA (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

A intoxicação alimentar causada por *S. aureus* se manifesta logo após a ingestão do alimento contaminado com enterotoxinas pré-formadas. A quantidade de enterotoxina necessária para causar a doença ainda não está bem estabelecida, mas sabe-se que depende da susceptibilidade do indivíduo, peso corporal e, especialmente, do estado de saúde da pessoa acometida (JABLONSKI; BOHACH, 2001). Para a formação de enterotoxinas, em quantidade suficiente para provocar intoxicação, são necessárias 10^5 a 10^6 células de *S. aureus* por grama de alimento (JABLONSKI; BOHACH, 2001). Além disso, o crescimento de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas são afetados por parâmetros físicos e químicos, como temperatura, pH, atividade de água (Aa), concentração de sal (NaCl) e disponibilidade de oxigênio (**Tabela 5**).

Tabela 5. Parâmetros importantes para crescimento de *S. aureus* e produção de enterotoxinas em alimentos.

Parâmetro	Crescimento		Produção de enterotoxinas	
	Ótimo	Variação	Ótimo	Variação
Temperatura (°C)	35 - 37	7 - 48	35 – 40	1 – 45
pH	6,0 – 7,0	4,0 – 10,0	6,0 – 7,0	4,8 – 9,0
Aa	>0,99	0,83 - 0,99	0,99	≥ 0,83 - 0,99
NaCl (%)	0 – 4	0 - 20	0 – 0,5	0 – 10
Atmosfera	Aeróbica	Aeróbica Anaeróbica	Aeróbica (5-20% de O ₂)	Aeróbica Anaeróbica

Fonte: ICMSF (1996) (Adaptada).

A intoxicação estafilocócica é, geralmente, de início repentino e severo, com náusea, vômitos e cólicas, prostração, hipotensão e hipotermia (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; BALABAN; RASOOLY, 2000; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Entretanto, a intensidade dos sintomas pode variar de acordo com o grau de suscetibilidade do indivíduo, com a concentração da enterotoxina presente no alimento e a quantidade de alimento ingerida. A recuperação ocorre em torno de dois dias, porém, alguns casos podem levar mais tempo ou exigir hospitalização (JABLONSKI; BOHACH, 2001). O período de incubação oscila de 30 minutos a 8 horas, porém, na maioria dos casos, os sintomas aparecem entre 2 e 4 horas após a ingestão do alimento contaminado (BANNERMAN, 2003).

Em uma intoxicação estafilocócica, as enterotoxinas apresentam algumas ações no trato gastrointestinal, entre as quais incluem-se a emética e a diarréica. A ação emética é o sintoma observado com maior frequência em uma intoxicação estafilocócica. Os sítios desta ação parecem localizar-se no intestino. O estímulo é transferido através do nervo vago ao centro do vômito e induz a retroperistalsia do estômago e do intestino delgado provocando vômitos intensivos (BALABAN; RASOOLY, 2000; DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000). A ação diarréica é o segundo sintoma mais comum na intoxicação. Embora seu mecanismo de ação ainda não seja bem conhecido, causa inflamação e irritação da mucosa do estômago e intestino delgado (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000).

A intoxicação estafilocócica, por ser uma doença de curso rápido (24-48 horas), e os indivíduos afetados, geralmente, não necessitarem de atendimento médico, a maioria dos casos não é notificada aos órgãos de Vigilância Sanitária, o que leva à subnotificação da doença no Brasil, bem como em outros países.

2.4.3. *Staphylococcus* enterotoxigênicos

A contaminação dos alimentos por espécies de *Staphylococcus* enterotoxigênicos representa um risco potencial para a saúde pública, uma vez

que algumas espécies, incluindo coagulase positiva e negativa, quando presente nos alimentos pode produzir uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas (SE) nos mesmos, os quais, depois de ingeridos, causam intoxicação estafilocócica aos consumidores.

Entre as espécies coagulase positiva, *S. aureus* é a mais relacionada a casos e surtos de intoxicação alimentar, devido à habilidade de muitas de suas cepas produzirem exotoxinas superantigênicas (PTSAg), como as enterotoxinas (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000). Outras espécies produtoras de coagulase, como *S. intermedius* (BECKER *et al.*, 2001) e *S. hyicus* (ADESIYUN; TATINI; HOOVER, 1984), também produzem enterotoxinas e têm sido envolvidas em alguns surtos (KHAMBATY; BENNET; SHAH, 1994; BENNET, 1996).

A produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* não produtores de coagulase, tais como, *S. capitis*, *S. cohnii* subsp *cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. warneri*, *S. xylosus* e *S. chromogenes* têm sido relatada em vários estudos, sendo a maioria sob condições de laboratório (VERNOZY-ROZAND *et al.*, 1996a; CHENG-CHUN; LI-FEN, 1997; PEREIRA *et al.*, 2001). Os resultados de alguns destes estudos sugerem que *Staphylococcus* não produtores de coagulase (RODRIGUEZ *et al.*, 1996; VERNOZY-ROZAND *et al.*, 1996b; UDO *et al.*, 1999) podem ser potenciais, causadores de intoxicação alimentar. Já foram relatados três surtos de intoxicação estafilocócica associados a espécies coagulase negativa (OMORI; KATO, 1959; BRECKINRIDGE; BERGDOLL, 1971; CARMO *et al.*, 2002b; VERAS *et al.*, 2003).

2.4.4. Enterotoxinas estafilocócicas e genes codificadores

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são um grupo de proteínas extracelulares de cadeia simples, com baixo peso molecular (26 a 30 kDa) e ponto isoelétrico de 7,0 a 8,6. São hidrossolúveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, permanecendo ativas após a ingestão (LE

LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). São produzidas durante toda fase do crescimento bacteriano, mas principalmente durante a fase exponencial (SORIANO *et al.*, 2002). Outra característica importante é sua termoestabilidade, sendo capazes de resistir a tratamentos térmicos como a pasteurização e a ultrapasteurização.

As enterotoxinas estafilocócicas são nomeadas com as letras do alfabeto de acordo com a ordem cronológica de suas descobertas. Até o momento, já foram descritos 18 tipos de enterotoxinas distintas (**Tabela 6**), mas com similaridade na estrutura e seqüência (BALABAN; RASOOLY, 2000). Atualmente, com base nas características antigênicas, são reconhecidos oito tipos sorológicos de enterotoxinas: SEA, SEB, SEC, SED SEE (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000) e as descritas recentemente SEH (REN *et al.* 1994; SU; WONG, 1995; OMOE *et al.* 2002), SEG e SEI (OMOE *et al.* 2002; JØRGENSEN *et al.* 2005). Outras 12 enterotoxinas (**Tabela 6**) foram identificadas e caracterizadas nos últimos anos (OMOE *et al.* 2005).

As cadeias polipeptídicas das enterotoxinas são ricas em aminoácidos lisina, ácido aspártico e ácido glutâmico e, caracterizadas por conter somente dois resíduos de cisteína e um ou dois resíduos de triptofano. A composição de aminoácidos das enterotoxinas SEA, SED e SEE é similar, o mesmo ocorrendo entre a SEB e a SEC (MARRACK; KAPPLER, 1990).

O seqüenciamento parcial dos aminoácidos das enterotoxinas SEA, SEB e SEC evidenciou a existência de uma região homóloga nas três moléculas, o que sugere ser esta região o sítio ativo da molécula de enterotoxina (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; JABLONSKI; BOHACH, 2001). Embora as enterotoxinas sejam similares em sua composição e atividade biológica, são identificadas separadamente em função de suas diferenças antigênicas. Várias enterotoxinas sorologicamente distintas têm sido reconhecidas e classificadas

Tabela 6. Tipos de enterotoxinas estafilocócicas e genes codificadores.

Tipos de SE	Genes codificadores	Referência
SEA	<i>sea</i>	Betley; Mekalanos (1988);Becker <i>et al.</i> (1998)
SEB	<i>seb</i>	Bergdoll <i>et al.</i> (1959); Jones; Khan (1986); Becker <i>et al.</i> (1998)
SEC ₁	<i>sec₁</i>	Bergdoll <i>et al.</i> (1965); Borja; Bergdoll (1967); Bohach; Schievert (1987); Becker <i>et al.</i> (1998)
SEC ₂	<i>sec₂</i>	Bergdoll <i>et al.</i> (1965); Avena; Bergdoll (1967);
SEC ₃	<i>sec₃</i>	Reiser <i>et al.</i> (1984)
SED	<i>sed</i>	Casman <i>et al.</i> (1967); Bayles; landolo (1989); Becker <i>et al.</i> (1998)
SEE	<i>see</i>	Bergdoll <i>et al.</i> (1971); Couch <i>et al.</i> (1988); Becker <i>et al.</i> (1998)
SEG	<i>seg</i>	Betley <i>et al.</i> (1992); Munson <i>et al.</i> (1998); Omoe <i>et al.</i> (2002)
SEGV	<i>seg_v</i>	Blaiotta <i>et al.</i> (2004)
SEH	<i>seh</i>	Ren <i>et al.</i> (1994); Su; Wong (1995); Omoe <i>et al.</i> (2002)
SEI	<i>sei</i>	Munson <i>et al.</i> (1998); Omoe <i>et al.</i> (2002)
SEI _v	<i>sei_v</i>	Blaiotta <i>et al.</i> (2004)
SEJ	<i>sej</i>	Zhang <i>et al.</i> (1998); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEK	<i>sek</i>	Orwin <i>et al.</i> (2001); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEL	<i>sel</i>	Fitzgerald <i>et al.</i> (2001); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEM	<i>sem</i>	Jarraud <i>et al.</i> (2001); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEN	<i>sen</i>	Jarraud <i>et al.</i> (2001); Orwin <i>et al.</i> (2003); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SENV	<i>sen_v</i>	Blaiotta <i>et al.</i> (2004)
SEO	<i>seo</i>	Jarraud <i>et al.</i> (2001); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEP	<i>sep</i>	Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEQ	<i>seq</i>	Yarwood <i>et al.</i> (2002); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SER	<i>ser</i>	Omoe <i>et al.</i> (2003); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEU	<i>seu</i>	Letertre <i>et al.</i> (2003)
SEUV	<i>seu_v</i>	Blaiotta <i>et al.</i> (2004)

de SEA até SEU e, seus genes, de *sea* até *seu*. Inicialmente, a toxina da Síndrome do Choque Tóxico foi equivocadamente identificada como SEF e por isso não existe a enterotoxina sorotipo F. Pequenas variações antigênicas da (SEC_{1, 2, 3}) têm sido descritas (AVENA; BERGDOLL, 1967; REISER *et al.*, 1984; BECKER; ROHT; PETERS, 1998) assim como duas SEH distintas (OMOE *et al.*, 2002). Normalmente, isto ocorre em cepas que secreta mais de um tipo de enterotoxinas OMOE *et al.*, 2005).

As enterotoxinas estafilocócicas são codificadas por bacteriófago (SEA e SEE), plasmídios como a SED (BAYLES; IANDOLO, 1989), cromossomo como a SEH e SEP (SU; WONG, 1995; OMOE *et al.*, 2002) ou ilhas de patogenicidade cromossomal a exemplo das enterotoxinas SEB, SEG, SEGV, SEI, SEI_v, SEM, (SU; WONG, 1995; JARRAUD *et al.*, 2001; MUNSON *et al.*, 1998; BLAIOTTA *et al.*, 2004), entre outras.

A relação entre as novas enterotoxinas e a intoxicação estafilocócica, ainda não está completamente elucidada. Há poucos relatos na literatura sobre a ocorrência dos genes que codificam estas novas enterotoxinas, os quais consideram principalmente amostras clínicas ou de coleções bacterianas (JARRAUD *et al.*, 1999; ABE *et al.*, 2000; JARRAUD *et al.*, 2001; OMOE *et al.*, 2002). Pouco se tem relatado sobre a detecção das novas enterotoxinas em cepas de *Staphylococcus*, principalmente *S. aureus*, isolados de alimentos (MCLAUCHLIN *et al.*, 2000; AKINEDEN *et al.*, 2001; ROSEC; GIGAUD, 2002; BLAIOTTA *et al.*, 2004; JØRGENSEN *et al.*, 2005). Por outro lado, os relatos sobre a ocorrência das enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC_{1, 2, 3}, SED e SEE) em alimentos são numerosos (DE LUCA; ZANETTI; STAMPI, 1997; ROSEC *et al.*, 1997; MEYRAND *et al.*, 1999; MCLAUCHLIN *et al.*, 2000; AKINEDEN *et al.*, 2001; ROSEC; GIGAUD, 2002; CHAPAVALL, 2003).

Para avaliar o papel das novas enterotoxinas na intoxicação alimentar estafilocócica é necessário o desenvolvimento de testes imunológicos para a

detecção destas enterotoxinas em alimentos. Até o momento, só há kits imunológicos disponíveis comercialmente para detecção das enterotoxinas clássicas (SEA a SEE).

Os principais métodos rápidos, disponíveis no mercado, para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em fluidos sobrenadantes de culturas de *Staphylococcus* spp. e em extratos de alimentos, são kits imunoenzimáticos que, em sua maioria, utilizam *ELISA* (*Enzyme-linked immunosorbent assay*); *LA* (*Latex agglutination*); *RPLA* (*Reversed passive latex agglutination*) e *ELFA* (*Enzyme linked Fluorescent Assay*) (PIMBLEY; PATEL, 1998). Entre os principais kits incluem-se: *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[®] Staph enterotoxin – SET* (*BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France*) (BRETT, 1998).

O kit *VIDAS[®] Staph enterotoxin* (SET) é um ensaio imunoenzimático que utiliza *ELFA* (Imunoensaio enzima ligada fluorescente) para a detecção simultânea de enterotoxinas estafilocócicas A, B, C₁, C₂, C₃, D e E em fluidos sobrenadantes de culturas de *Staphylococcus* spp. e extratos de alimentos. O ensaio é executado no sistema *VIDAS[®]* que alia a moderna automatização de diferentes testes unitários realizados simultaneamente utilizando a metodologia *ELFA*. Este teste imunológico é similar ao *ELISA*, apresentando como diferença o substrato 4 MUP (4 Metil umbeliferil fosfato) que, após ser hidrolisado pela enzima fosfatase alcalina, se transforma em umbeliferona, emitindo fluorescência a 450nm. A intensidade de fluorescência liberada é medida, e determina o resultado. A maior especificidade do teste *ELFA* é dada em função do tipo de reação que ocorre no ensaio (sanduíche indireto, sanduíche direto, competição e imunocaptura). O equipamento mini *VIDAS[®]* realiza automaticamente todas as etapas da reação até a leitura final (*BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France*).

O gene *femA* tem sido explorado como marcador específico de *S. aureus* em testes baseados em pesquisa de DNA. Este gene codifica um fator essencial para a resistência a meticilina e está universalmente presente em todas as cepas de *S. aureus* (MEHROTA; WANG; JOHNSON, 2000). A amplificação do gene *femA* ou parte dele por PCR é uma ferramenta útil na diferenciação de espécies de *Staphylococcus* sendo, portanto, uma alternativa rápida e segura para identificação desta bactéria (MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000; ARCURI *et al.* 2004; LANGE *et al.* 2004; FREITAS, 2005).

A multiplex PCR consiste na amplificação simultânea de vários genes pelo uso de múltiplos pares de *primers* na mesma reação. Vários testes multiplex PCR têm sido desenvolvidos para detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas (VERNOZY-ROZAND *et al.*, 1996b; BECKER; ROTH; PETERS, 1998; MEHROTA; WANG; JOHNSON, 2000). Monday e Bonach (1999) desenvolveram um teste de multiplex PCR para detecção dos genes das toxinas SEA a SEJ. Dodd, Sharma e Rees (2000) desenvolveram um teste multiplex PCR de reação única para genes das enterotoxinas de *S. aureus* que utiliza um *primer* universal de genes de toxinas em combinação com *primers* toxina-específicos, para amplificar produtos característicos de genes de toxinas estafilocócicas.

2.4.5. Ocorrência de *Staphylococcus* enterotoxigênico e de enterotoxinas em leite e produtos lácteos

A presença de *Staphylococcus* enterotoxigênicos e suas enterotoxinas têm sido constatada com frequência em produtos lácteos, principalmente em leite cru e queijos (ROSEC; GIGAUD, 2002; SENA, 2000; LAMAITA *et al.*, 2005; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). O leite cru obtido de animais com infecção estafilocócica nas glândulas mamárias (mastite) é a principal fonte de cepas *S. aureus* enterotoxigênicos.

Na Califórnia, Cenci-Goga e outros (2003) isolaram 160 cepas de *S. aureus* em leite proveniente de vacas com mastite, das quais 13,8% (22) produziram enterotoxinas SEC ou SED, 4,4% (7) SEC, 7,5% (12) SED e 1,9% (3) produziram SEC e SED. Em outro estudo realizado na Alemanha, Akineden e outros (2001) obtiveram 103 isolados característicos de *Staphylococcus* de leite produzido por 60 vacas com mastite, oriundas de oito fazendas de diferentes municípios. Todos isolados foram identificados como *S. aureus* e os resultados confirmados com a amplificação de fragmentos de DNA pela PCR do gene que codifica o 23S rRNA, característico desta bactéria. Pela PCR foram detectados os genes que codificam enterotoxinas SEA, SEC, SED, SEG, SEI e SEJ.

Na Itália, no período de 2000 a 2002, Normanno e outros (2005) investigaram a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva e *S. aureus* em 9.869 amostras de vários produtos de origem animal, sendo 3.097 de leite (leite cru e leite pasteurizado) e derivados (queijo, coalhada, ricota, sorvetes e outros produtos lácteos). A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva foi constatada em 21% (641) amostras avaliadas. Dentre os 364 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva obtidos, 362 foram identificados como *S. aureus*, e destes 217 (59,9%) eram enterotoxigênicos. Estas cepas produziram SEA (26,7%), SEB (0,9%), SEC (28,1%), SED (15,7%), SEA e SEB (1,8%), SEA e SED (26,0%), SEA e SEC (0,5%) e SEC e SED (0,5%). Em outro estudo, De Luca, Zanetti e Stampi (1997) avaliaram a contaminação de produtos lácteos, comercializados em Bologna, por *S. aureus* e *Staphylococcus* sp. *S. aureus* foi detectado em 16,3% das 135 amostras de queijos analisados, assim distribuídos: 8,3% em queijo macio; 17,6 em queijo azul; 18,9% em queijo seme-macio e 25% em queijo mussarela.

Na França, Rosec e outros (1997) isolaram 213 cepas de *S. aureus* em 121 gêneros alimentícios, incluindo leite e queijos, e constataram que 30,5% (65/213) das cepas produziam ao menos uma ou duas das cinco enterotoxinas clássicas. Em outro estudo, Rosec e Gigaud (2002) avaliaram 332 cepas de *S. aureus*,

provenientes de vários alimentos produzidos no país e constataram uma frequência muito alta (57%) de cepas que apresentavam genes que codificam SEG, SEH, CEI e SEJ, além de genes das enterotoxinas clássicas. Na Eslováquia, Holecková e outros (2002) avaliaram a ocorrência de *S. aureus* enterotoxigênicos em vários alimentos, e verificaram alta percentagem de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicos em queijo de leite de ovelha. Dos 19 isolados de queijo de ovelha, nove (47,4%) produziram enterotoxinas, com prevalência de SEB (36,8%). Na Noruega, Loncarevic e outros (2005) constataram grande diversidade de produção de enterotoxinas por cepas de *S. aureus* isoladas de leite cru e produtos lácteos obtidos de leite cru.

No Brasil têm sido realizadas muitas pesquisas para avaliar o potencial enterotoxigênico e a produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* sp. isoladas de alimentos, principalmente queijo Minas frescal (SABIONI; HIROOKA; SOUZA, 1988; ARAÚJO *et al.*, 2004) e queijo de coalho (FLORENTINO; MARTINS, 1999; BORGES *et al.*, 2003; FEITOSA *et al.*, 2003).

Almeida Filho e Nader Filho (2000) avaliaram a ocorrência de *S. aureus* em 80 amostras de queijo Minas frescal produzido artesanalmente e comercializado em Poços de Caldas – MG e constataram a presença da bactéria em 50% (40) dos queijos, em níveis em torno de 10^5 UFC/g, próximo ao necessário para a produção de enterotoxinas. Persi (2001) investigou a qualidade microbiológica de 30 amostras de queijo Minas frescal artesanal e 30 de origem industrial, comercializadas em São José do Rio Preto – SP e verificaram que sete queijos industriais e 23 artesanais estavam em desacordo com os padrões estabelecidos pela legislação, em função das altas contagens de coliformes fecais ou *Staphylococcus* coagulase positiva. Carvalho (2003) avaliou o nível de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo Minas frescal, obtidos por diferentes técnicas de processamento e observou que 7,5% dos queijos apresentavam contagens superiores aos padrões da legislação vigente.

Nicolau e outros (2001) avaliaram o potencial de produção e tipos de enterotoxinas estafilocócicas produzidas por cepas de *S. aureus* em extratos de amostras de queijo mussarela, fabricado na região de Goiânia – GO. A presença do patógeno foi observada em 58,2% (127/218) das amostras e 9,8% (13/132) das cepas *S. aureus* analisadas apresentaram potencial para produção de enterotoxinas. Das 13 cepas enterotoxigênicas 61,5% (8) produziram SEA, 23,1% (3) SEB, 7,7% (1) SEC, e 7,7% (1) SEA e SEB. Nos extratos de queijo a presença de enterotoxinas foi detectada em 9,2% (7/76) das amostras, sendo que destas, 71,5% (5) eram SEA e 28,5% (2) SEB.

Lamaita e outros (2005) observaram a produção de enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC e SED) em cepas coagulase positiva e negativa isoladas de 80 amostras de leite cru refrigerado, oriundo de diferentes propriedades rurais e verificaram maior frequência de SEC e SEB, seguidas de SED e SEA, sendo o maior percentual de cepas enterotoxigênicas observado em *Staphylococcus* coagulase negativa. Foi ressaltado que o elevado índice de cepas coagulase negativa enterotoxigênicas era preocupante, uma vez que estes microrganismos não são contemplados pela legislação vigente.

Cunha Neto e outros (2002) isolaram *Staphylococcus* enterotoxigênicos em vários alimentos, incluindo queijo de coalho e leite em pó integral, comercializados em Recife – PE. As contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva variaram de $<10^2$ a $1,5 \times 10^4$ UFC/g para estes dois produtos e 100% das cepas isoladas de queijo de coalho foram positivas para enterotoxinas estafilocócicas clássicas. Em outro estudo, Sena (2000) analisou 90 amostras de queijo de coalho comercializadas em Recife – PE e isolou 377 cepas de *Staphylococcus*, assim distribuídas: 218 (57,8%) de *S. aureus*; 96 (25,5%) de *S. epidermidis*; 41 (10,9%) de *S. hyicus*; e 22 (5,8%) de *S. intermedius*. Pools de cepas foram testados quanto ao potencial de produção de enterotoxinas por indução sob condições laboratoriais e observou-se que dos 78 pools de cepas de *S. aureus*, 48 (61,5%) produziram SEB; 10 (12,5%) SEC e 2 (2,5%) SED. Dos 11 pools de *S.*

intermedius, 7 (63,6%) produziram SEB e os *pools* de *S. epidermidis* e de *S. hyicus* não produziram enterotoxinas. Lima (2005) avaliou a incidência de *Staphylococcus* coagulase positiva em 80 amostras de queijo de coalho industrial e artesanal comercializado em Fortaleza – CE e constatou que 54% (43) dos queijos estavam contaminados com esta bactéria, cujas contagens oscilaram entre $4,4 \times 10^4$ a $1,7 \times 10^7$ UFC/g. A presença de enterotoxinas estafilocócicas não foi observada nas amostras analisadas. Apenas 8,3% (1/12) dos *pools* de cepas de *Staphylococcus* produtores de coagulase foram positivos para enterotoxinas estafilocócicas clássicas.

A ocorrência de altos níveis de *Staphylococcus* coagulase positiva e *S. aureus*, em queijo de coalho produzido em vários estados do Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte) tem sido relatada em muitos estudos (FLORENTINO; MARTINS, 1999; MENDES *et al.*, 1999; PAIVA; CARDONHA, 1999; RAPINI *et al.*, 2002; FEITOSA *et al.*, 2003; BORGES *et al.*, 2003). Na maioria destes estudos, os queijos foram classificados como impróprios para o consumo humano, dada a constatação de níveis de contaminação superiores aos permitidos pela legislação de 10^3 UFC/g (ANVISA, 2001).

No Ceará, Borges e outros (2003) avaliaram 43 amostras de queijo de coalho, produzido em 11 municípios, pertencentes a cinco microrregiões produtoras de leite, e verificaram que 91% (39) das amostras estavam contaminadas por *Staphylococcus* coagulase positiva em níveis superiores ao estabelecido pela legislação (10^3 UFC/g). Em outro estudo, Bruno e outros (2005) observaram que 50% (4/8) das amostras de queijo de coalho artesanais e industriais analisadas estavam em desacordo com os padrões microbiológicos devido à elevada contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva ($3,2 \times 10^7$ a $3,0 \times 10^8$ UFC/g). Em pesquisa similar, Hiluy e Araújo (1999) analisaram 25 amostras de queijo de coalho e constataram que 96% dos queijos apresentavam contagens acima do limite estabelecido pela legislação (10^3 UFC/g). Santos, Nogueira e Cunha (1995) observaram que 62,5% (31/56) dos queijos de coalho não

atendiam os padrões microbiológicos em função da elevada contagem de *S. aureus*.

No Rio Grande do Norte, Feitosa e outros (2003) observaram que 72,7% (8/11) das amostras de queijo de coalho de microrregiões do Estado, apresentavam contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva em níveis superiores ao estabelecido pela legislação. Em outra pesquisa, Paiva e Cardonha (1999) avaliaram 20 amostras de queijos, das quais dez eram artesanais e dez industriais, comercializadas em Natal – RN e constataram que 30% (6/20) dos queijos estavam em desacordo com os padrões microbiológicos vigentes devido às altas contagens de *S. aureus*.

Em Pernambuco, Mendes e outros (1999) investigaram a qualidade microbiológica de 105 amostras de queijo de coalho comercializadas em Recife – PE, procedentes de 15 municípios, e verificaram que em todos os municípios havia queijos que apresentavam contaminação por *S. aureus* em níveis superiores ao estabelecido pela legislação. A porcentagem de amostras fora dos padrões variou em torno de 13% a 90%.

Em uma avaliação de queijo de coalho comercializado nas praias de Salvador e Maceió, Rapini e outros (2002) observaram que 100% das amostras estavam contaminadas por *Staphylococcus* sp. e por enterotoxinas SEB e SEC.

2.4.6. Surto de intoxicação estafilocócica associados ao consumo de leite e produtos lácteos

Surto e casos esporádicos de intoxicação estafilocócica atribuída ao consumo de produtos lácteos, principalmente queijos, têm sido relatados em vários países (SABIONI; NASCIMENTO; PEREIRA, 1994; ALTEKRUSE, *et al.*, 1998; MEYRAND; VERNOSY-ROZAND, 1999; DE BUYSER *et al.*, 2001; LECLERC *et al.*, 2002; CARMO *et al.*, 2002b). A contaminação de queijos é atribuída principalmente à utilização de leite cru na sua fabricação ou à falhas que ocorrem

durante o processamento, principalmente na pasteurização e na manipulação após o processamento ou na distribuição do produto.

Nos Estados Unidos, no período de 1993-1997, *S. aureus* foi envolvido em 42 surtos de intoxicação alimentar, com 1.413 casos notificados e um óbito (OLSEN *et al.*, 2000). Leite e queijos estavam entre os alimentos envolvidos. Atualmente a intoxicação estafilocócica representa cerca de 4,0% das doenças de origem alimentar bacteriana, sendo responsável por 1.753 hospitalizações e duas mortes a cada ano (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2006).

Na Europa, no período de 1993-1998, surtos de intoxicações estafilocócicas foram monitorados em vários países. Os produtos lácteos foram responsáveis por 3,9% dos surtos na Alemanha; 5,4% na Bélgica; 9,1% na Escócia; 1,6% na Espanha; 26% na França; 3,0% na Inglaterra e Países de Gales; 3,6% na Itália; 5,0% na Holanda; 1,7% em Portugal; 1,7% na Suécia (FAO/WHO, 2002). Na Noruega, no período de 1993-1998, 24,2% dos surtos de doenças de origem alimentar foram causados por *S. aureus* e 6,7% dos alimentos incriminados eram produtos lácteos (FAO/WHO, 2002).

No Japão, entre 1987-1996, ocorreram 32 casos de doenças de origem alimentar, atribuída a *S. aureus*, em escolas e berçários escolares, afetando 2.846 crianças (MICHINO; OTSUKI, 2000). Em julho de 2000, houve outro grande surto de intoxicação atribuído ao consumo de iogurte, elaborado com leite com baixo teor de gordura e leite em pó desnatado contaminado com enterotoxina A, e envolveu 13.420 notificações (NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES, 2001; ASAO *et al.*, 2003).

Segundo registros do Sistema de Informação para a Vigilância das Enfermidades Transmitidas por Alimentos na América Latina e Caribe (SIRVETA), no período de 1993 a 2002, ocorreram 250 surtos de intoxicação estafilocócica envolvendo produtos lácteos, com acometimento de 4.247 pessoas, em 11 países

desta região. Há 16 relatos de surtos causados por queijos ocorridos no Brasil, com 86 pessoas acometidas (**Tabela 7**). Destes surtos, dois foram notificados no estado do Ceará no ano de 2000, atribuídos ao consumo de queijos e envolveu 14 pessoas (INPPAZ/OPS/OMS, 2006).

Tabela 7. Relatos de surtos de intoxicação estafilocócica atribuídos ao consumo de produtos lácteos no Brasil, no período de 1993-2002.

Local	Veículo	Agente etiológico	Nº de pessoas envolvidas
Belo Horizonte - MG	Queijo	<i>S. aureus</i>	3
Belo Horizonte - MG	Queijo	<i>S. aureus</i>	8
Belo Horizonte - MG	Queijo	<i>S. aureus</i>	3
Arapongas – PR	Queijo colonial	<i>S. aureus</i>	7
Curitiba – PR	Queijo	<i>S. aureus</i>	3
Curitiba – PR	Queijo	<i>S. aureus</i>	4
Curitiba – PR	Queijo	<i>S. aureus</i>	4
P. Fontim – PR	Queijo	<i>S. aureus</i>	5
Viamão – RS	Queijo	<i>S. aureus</i>	4
Rio Grande - RS	Queijo	<i>S. aureus</i>	12
Caxias do Sul - RS	Queijo	<i>S. aureus</i>	8
Quedas do Iguaçu - PR	Queijo colonial	<i>S. aureus</i>	4
Itapajé – CE	Queijo	<i>S. aureus</i>	7
Porto Alegre - RS	Queijo colonial	<i>S. aureus</i>	3
Fortaleza – CE	Queijo	<i>S. aureus</i>	7
Autazes – AM	Queijo	<i>S. aureus</i>	4
Total			86

Fonte: INPPAZ/OPS/OMS (2006).

No Brasil, o número de surtos e casos esporádicos de intoxicações estafilocócicas são superiores aos reportados pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Muitos casos não são notificados ou investigados devido, principalmente, ao rápido curso da doença. No período de 1999 a 2004 foram notificados 3064 surtos de DTA à SVS, com acometimento de 57.353 pessoas e

registro de 37 óbitos. *S. aureus* foi identificado em 18,1% dos casos, ocupando a segunda posição entre os agentes etiológicos identificados (CARMO *et al.*, 2005).

Os surtos de DTA investigados envolvendo produtos lácteos têm sido associados principalmente ao consumo de queijos do tipo Minas frescal, Minas Padrão e de queijo de coalho. Sabioni, Hirooka e Souza (1988) investigaram um surto ocorrido em uma família de baixa renda, devido a queijo Minas frescal contaminado por *S. aureus* em Ouro Preto – MG, em julho de 1987. O nível de contaminação detectado no queijo foi de $9,3 \times 10^7$ UFC/g e as cepas isoladas eram produtoras de enterotoxinas SEA, SEB, SED e SEE. Nesta cidade, em janeiro de 1992, ocorreu outro surto de intoxicação estafilocócica atribuído ao consumo de queijo Minas. *S. aureus* foi o agente etiológico e o nível de contaminação detectado nos queijos variou de $7,0 \times 10^5$ a $2,1 \times 10^8$ UFC/g. Além disso, 93,7% das cepas eram produtoras de enterotoxinas SEA, SEB ou SED (SABIONI; NASCIMENTO; PEREIRA, 1994).

Pereira e outros (1996) relataram um surto causado pelo consumo de queijo Minas, ocorrido no estado de Minas Gerais, envolvendo sete pessoas de uma família e *S. aureus* foi o agente etiológico identificado. A população do patógeno nos queijos foi $2,9 \times 10^8$ UFC/g e foram detectadas cepas de *S. aureus* produtoras de enterotoxina SED. No extrato do queijo foi detectado 180ng/mL de enterotoxina SEH. Carmo e outros (2002b) relataram a ocorrência de dois surtos de intoxicação estafilocócica causados pelo consumo de queijo Minas e leite, ocorridos em Manhuaçu e Passa Quatro – MG. O primeiro surto foi atribuído ao consumo de queijo Minas e envolveu 50 pessoas. O queijo e o leite cru utilizado na sua fabricação apresentaram contagens de *S. aureus* na faixa de $2,4 \times 10^3$ a $2,0 \times 10^8$ UFC/g e continham enterotoxinas SEA, SEB e SEC. O segundo surto foi causado pelo consumo de leite cru e 328 pessoas foram afetadas. O leite apresentou contagens de *Staphylococcus* coagulase negativa superior a $2,0 \times 10^8$ UFC/mL e estava contaminado com enterotoxinas SEC e SED. A

contaminação do queijo foi atribuída á manipuladores durante a elaboração do produto e à contaminação do leite por mastite.

No período de 1997 a 2002, vários surtos de intoxicação alimentar, ocorridos no estado de Minas Gerais, foram investigados pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Leite e produtos derivados (queijo canastra, queijo curado, queijo Minas, queijo mussarela, queijo ralado, requeijão e bebida Láctea) foram envolvidos em muitos casos. 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, conforme relatórios da FUNED, no período de 1995 a 2001, alimentos contaminados com enterotoxinas estafilocócicas produzidas por *S. aureus* causaram 112 surtos com o envolvimento de 12.820 pessoas e 17 mortes. Diversos tipos de queijos foram responsáveis por 23 destes surtos, com 600 pessoas acometidas e um óbito (CARMO, 2002a).

No Ceará, o Núcleo de Epidemiologia da Secretária de Saúde do Estado do Ceará, através do Informe Anual de Surtos de DTA em 2003, notificou cinco surtos de DTA, envolvendo 311 pessoas. Um surto foi atribuído ao consumo de queijo Minas frescal e queijo de coalho. Onze pessoas foram acometidas por intoxicação estafilocócica (CEARÁ, 2004).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, J.; ITO, Y.; ONIMARU, M.; KOHSAKA, T.; TAKEDA, T. Characterization and distribution of a new enterotoxin-related superantigen produced by *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 44, n. 2, p. 79-88, Feb., 2000.

ADESIYUN, A. A.; TATINI, S. R.; HOOVER, D. G. Productions of enterotoxins by *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, Shannon, v.9, n. 5, p. 487-495, Sept., 1984.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 10 jan. 2001b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>>. Acesso em: 07 fev. 2006.

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

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

ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C. A PCR protocol using *inl* gene as a target specific detection of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 97-101, Jan., 2000.

ALTEKRUSE, S. F.; TIMBO, B. B.; MOWBRAY, J. C.; BEAN, N. H.; POTTER, M. E. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 7, p. 709-725, Oct., 1998.

ARAÚJO, R. A. B. M.; MARTINS, J. M.; PINTO, M. S.; OLIVEIRA, P. N.; OLIVEIRA, R. C.; FURTDO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Avaliação microbiológica do queijo artesanal da região de Araxá – MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 93-96, jul./ago., 2004.

ARCURI, E. F.; OLIVEIRA, R. C.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C.; BRITO, M. A. Avaliação do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus aureus* isolados de

leite cru refrigerado pela detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec*, e *sed* através da PCR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo. **Anais**. Passo Fundo: Universidade Federal de Passo Fundo, 2004. p. 1-3.

ASAO, T.; KUMEDA, Y.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**, London, v. 130, n. 1, p. 33-40, Jan., 2003.

AVENA, R. M.; BERGDOLL, M. S. Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361. **Biochemistry**, Columbus, v. 6, n. 6, p. 1474-1480, June, 1967.

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

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase positive Coci that grow aerobically. In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8rd ed. Washington D. C.: ASM, 2003. v. 1, Chap. 28, p. 384-404.

BARRETT, J. N. Communicable disease associated with milk and dairy products in England and Wals: 1983-1984. **The Journal Infectious**, London, v. 12, n. 3, p. 265-272, May, 1986.

BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, v. 9, p. 4799-4806, Sept., 1989.

BECKER, K.; KELLER, B.; von EIFF, C.; BRUCK, M.; LUBRITZ, G.; ETIENNE, J.; PETERS, G. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. **Applied**

and Environmental Microbiology, Washington, v. 67, n. 12, p. 5551-5557, Dec., 2001.

BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 9, p. 2548-2553, Sept., 1998.

BENNET, R.W. Atypical toxigenic *Staphylococcus* and non-*Staphylococcus aureus* species on the horizon? An update. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 10, p. 1123-1126, Oct., 1996.

BERGDOLL, M. S.; SURGALA, J.; DACK, G. M. Staphylococcal enterotoxin. Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 83, n. 3, p. 334-338, Mar., 1959.

BERGDOLL, M. S.; BORJA, C. R.; AVENA, R. M. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 90, n. 5, p. 1481-1485, Nov., 1965.

BERGDOLL, M. S.; BORJA, C. R.; ROBBINS, R.; WEISS, K. F. Identification enterotoxin E. **Infection and Immunity**, Washington, v. 4, n. 5, p. 593-593, Nov., 1971.

BETLEY, M. J.; MEKALANOS, J. J. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 1, p. 34-41, Jan., 1988.

BETLEY, M. J.; BORST, D. W.; REGASSA, L. B. Staphylococcal enterotoxin, toxic shock syndrome and staphylococcal pyrogenic enterotoxins: a comparative study

of their molecular biology. **Chemical and Immunology**, New York, v. 55, p. 1-35, n.1, Jan., 1992.

BILLE, J.; ROCOURT, J. *Listeria and Erysipelothrix*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8th ed. Washington D. C.: ASM, 2003. v. 1, Chap. 33, p. 461-471.

BLAIOTTA, G.; ERCOLINE, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. Strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seL in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 97, n. 5, p. 719-730, May, 2004.

BOHACH, G. A.; SCHIEVERT, P. M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C₁ gene and relatedness to other pyrogenic toxins. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 209, n. 1, p. 15-20, Aug., 1987.

BOPP, A. C.; BRENNER, F. W.; FIELDS, P. I.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A. *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8th ed. Washington D. C.: ASM, 2003. v. 1, Chap. 42, p. 654-671.

BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, E. H. F de; FIGUEIREDO, E. A. T. Microrganismos patogênicos e em queijo de coalho produzido no Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 31-40, jan./jun., 2003.

BORJA, C. R.; BERGDOLL, M. S. Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by *Staphylococcus aureus* strain 137. **Biochemistry**, Columbus, v. 6, n. 5, p. 1467-1473, May, 1967.

BORUCKI, M. K.; KIM, S. H.; CALL, D. R.; SMOLE, S. C.; PAGOTTO, F. Selective discrimination of *Listeria monocytogenes* epidemic strains by a mixed-genome DNA microarray compared to discrimination by pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping, and multilocus sequence typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 11, p. 5270-5276, Nov., 2004.

BRANCO, M. A. A. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; BORGES, M. F.; SILVA, M. C. D.; DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 393-408, jun./dez., 2003.

BRECKINRIDGE, J. C.; BERGDOLL, M. S. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin producing *Staphylococcus*. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 284, n. 10, p. 541-543, Oct., 1971.

BRETT, M. M. Kits for detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, London, v. 84, n. S1, p. 110S-118S, July, 1998.

BRUNO, L. M.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; CARVALHO, J. D. G.; ANDRADE, A. A. Avaliação microbiológica de queijo de coalho artesanais e industrializados comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n. 345, p. 217-220, jul./ago, 2005.

BÜLA, C. J.; BILLE, J.; GLAUSER, M. P. An epidemic of food-borne listeriosis in Western Switzerland: decryption of 57 cases involving adults. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 20, n. 1, p. 66-72, Jan., 1995.

BUSANI, L.; CIGLIANO, A.; TAIOLI, E.; CALIGIURI, V.; CHIAVACCI, L.; DI BELLA, C.; BATTISTI, A.; DURANTI, A. GIANFRANCESCHI, M.; NARDELLA, M. C.; ROLESU, S.; TAMBA, M.; MARABELLI, R.; CAPRIOLI, A. Prevalence of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* contamination in food of animal

origin in Italy. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 8, p. 1729-1733, Aug., 2005.

CARMO, G. M. I.; OLIVEIRA, A. A.; DIMECH, C. P.; SANTOS, D. A.; ALMEIDA, M. G.; BERTO, L. H.; ALVES, R. M. S.; CARMO, E. H. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico** - Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, ano 5, n. 6, p. 1-7, dez., 2005. Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf. Acesso em: 19 jul. 2006.

CARMO, L. S. **Intoxicação alimentar. Revista Minas faz Ciências**, Belo Horizonte, n. 11, p. 1-2, jun./ago, 2002a. Disponível em:

<<http://revista.fapemig.br/11/index.html>>. Acesso em: 27 abr. 2006.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, London, v.19, n. 1, p. 9-14, Jan./Feb., 2002b.

CARRIQUE-MAS, J. J.; HÖKEBERG, I.; ANDERSON, Y.; ARNEBORN, M.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M.-L.; OSTERMAN, B.; LEFFFLER, M.; STEEN, M.; ERIKSSON, E.; HEDIN, G.; GIESECKLE, J. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese – an outbreak of listeriosis? **Epidemiology and Infection**, London, v. 130, n.1, p. 79-86, Feb., 2003.

CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo Minas Frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas**. 2003. 107p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CASHELL, M. Food poisoning outbreaks: the environmental health experience. Dublin. In: INTERNATIONAL EU-RAIN CONFERENCE FOOD PATHOGEN EPIDEMIOLOGY: MICROBES, MALADIES AND METHODS, 1, 2004, Padua. **Proceedings**. Dublin: Teagasc - The National Food Center, 2004. Part I. p. 27-33. Disponível em: <<http://www.eu-rain.com/publications/docs/EpidemProPart1.pdf>>. Acesso em: 07 fev. 2006.

CASMAN, E. P. Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 79, n. 6, p. 849-856, June, 1960.

CASMAN, E. P.; BENNETT, R. W.; DORSEY, A. E.; ISSA, J. A. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 94, n. 6, p. 1875-1882, Dec., 1967.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., Coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 281-287, set/dez., 2001.

CAVALCANTE, J. F. M. **Sistema de apoio á decisão na produção de leite e queijo coalho com segurança alimentar**. 2005. 158p. Tese (Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; SILVA, R. F. N. Valorização do queijo de artesanal brasileiro: caso do queijo de coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 215-218, jul./ago., 2004.

CEARÁ. Secretaria da Saúde do Estado do Ceará. Núcleo de Epidemiologia. Célula de Vigilância Epidemiológica. **Informe anual de surtos das doenças transmitidas por alimentos**. Fortaleza, 2004. 4p.

CENCI-GOGA, B. T.; KARAMA, M.; ROSSITTO, P. V.; MORGANTE, R. A.; CULLOR, J. S. Research Note Enterotoxin Production by *Staphylococcus aureus* Isolated from Mastitic Cows. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 9, p. 1693–1696, Sept., 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Final FoodNet Surveillance Report**. Atlanta: Department of Health and Human Services / CDC, 2003a. 29p. Disponível em: http://www.cdc.gov/foodnet/annual/2003/2003_report.pdf. Acesso em: 07 Feb. 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Multistate outbreak of *Salmonella* serotype Typhimurium infections associated with drinking unpasteurized milk - Illinois, Indiana, Ohio, and Tennessee, 2002-2003. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 52, n. 26, p. 613-615, July, 2003b.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food - 10 sites, United States, 2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 54, n. 14, p. 352-356, Apr., 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Salmonella surveillance: Annual Summary, 2004**. Atlanta: United States Department of Health and Human Services, CDC, 2005. 15p. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2004/Salmonellainroduction2004.pdf>. Acesso em: 08 Mar. 2006.

CHAPAVAL, L. **Detecção de enterotoxinas estafilocócicas produzidas por *Staphylococcus aureus* no leite bovino por eletroforese capilar e identificação dos isolados enterotoxigênicos via PCR.** 2003. 140p. Tese (Doutor em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CHENG-CHUN, C.; LI-FEN, C. Enterotoxin production by *Staphylococcus warneri* CCRC 12929, a coagulase-negative strain. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 8, p. 923–927, Aug., 1997.

CHURCHILL, R. L. T.; LEE, H.; HALL, J. C. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 141-170, Jan., 2006.

CLARKE, S. C.; HAIGH, R. D.; FREESTONE, P. P. E.; WILLIAMS, P. H. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 16, n. 3, p. 365-378, July, 2003.

CODY, S. H.; ABBOTT, S. L.; MARFIN, A. A.; SCHULZ, B.; MOHLE-BOETANI, P. J. C.; VUGIA, D. J. Two Outbreaks of Multidrug-Resistant *Salmonella* Serotype Typhimurium DT104 Infections Linked to Raw-Milk Cheese in Northern California. **The Journal of the American Medical association**, Chicago, v. 281, n. 19, p. 1805-1810, May, 1999.

COLAK, H.; HAMPIKYAN, H.; BINGOL, E. B.; ULUSOY, B. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. **Food Control**, Oxford, *In Press*.

CORDANO, A. M.; ROCOURT, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 70, n. 1/2, p. 175-178, Oct., 2001.

COUCH, SOLTIS, M. T.; BETLEY, M. J. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 7, p. 2954-2960, July, 1988.

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

DALTON, C. B.; AUSTIN, C. C.; SOBEL, J.; HAYES, P. S.; BIBB, W. F.; GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B.; PROCTOR, M. E.; GRIFFIN, P. M. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 336, n. 2, p. 100-105, Jan., 1997.

DALTON, C. B.; GREGORY, J.; KIRK, M. D.; STAFFORD, R. J.; GIVNEY, R.; KRAA, E.; GOULD, D. Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000. **Communicable Diseases Intelligence**, Canberra, v. 28, n. 2, p. 211-224, Feb., 2004.

D'AOUST, J. Y.; MAURER, J.; BAILEY, J. S. *Salmonella* species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.) **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. 2nd ed., Washington: ASM, 2001. Chap. 18, p. 383-409.

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

DE LUCA, G.; ZANETTI, F.; STAMPI, S. *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 267-270, Apr., 1997.

DE RÉU, K.; DEBEUCKELAERE, W.; BOTTELDOORN, N.; DE BLOCK, J.; HERMAN, L. Hygienic parameters, toxins and pathogen occurrence in raw milk cheeses. **Journal Food Safety**, Tumbuil, v. 22, n. 3, p. 183-196, Sept., 2002.

DE VOS, P.; TRÜPER, H. G.; TINDALL, B. J. Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes Xth International (IUMS) Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Minutes of the meetings, 28, 29 and 31 July and 1 August 2002, Paris, France. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, n. 1, p. 525-532, Jan., 2005.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Minneapolis, v. 13, n. 1, p. 16-34, Jan., 2000.

DI PIETRO, S.; HARITCHABALET, K.; CANTONE, G.; IGLESIAS, L.; MANCINE, S.; TEMPERONI, A.; LABANCHI, J. L.; BARBAROSSA, N.; GARCIA, M. T.; COGRE, M.; ROSLES, S.; HERRERO, E.; BIGATTI, R.; ORELLANA, O.; LARRIEU, E. Surveillance of foodborne diseases in the province of Rio Negro, Argentina, 1993-2001. **Medicina**, Buenos Aires, v. 64, n. 2, p. 120-124, Mar./Apr., 2004.

DODD, C. E. R.; SHARMA, N. K.; REES, C. E. D. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, p. 1347-1353, Apr., 2000.

DONELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*. In: HUI, Y.H.; PIERSON, M.D.; GORHAM, J.R. (Ed.). **Foodborne disease handbook**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2001. v. 1. Chap. 10, p. 213-246.

DUARTE, D. A. M.; SCHUCH, D. M. T.; SANTOS, S. B.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SILVA, J. V. D.; MOTA, R. A. Pesquisa de *Listeria*

monocytogenes e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado do Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 297-302, jul./set, 2005.

ELLIS, A.; PRESTON, M.; BORCZYK, A.; MILLER, B.; STONE, P.; HATTON, B.; CHAGLA A.; HOCKIN, J. A community outbreak of *Salmonella Berta* associated with a soft cheese product. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 120, n. 1, p. 29-35, Jan., 1998.

EL-GAZZAR; F.; MARTH, E. H. *Salmonellae*, salmonellosis, and dairy foods: a review. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 75, n. 9, p. 2327-2343, Sept. 1992.

ESCOBAR, C. A. M.; LEUTHIER, S.; ANTUNES, G.; ALBUQUERQUE, R. C. L. Avaliação dos pontos críticos na produção de queijo de coalho em Pernambuco. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 56, n. 321, p. 248-256, jul./ago., 2001.

ESPER, L. M. R. **Diagnóstico da qualidade de ricotas comercializadas no município de Campinas – SP**. 2006. 114p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

ESPINOZA, A. M.; TORRE, M. D. L.; SALINAS, M. F.; SÁNCHEZ, V. P. Determinación de *Listeria monocytogenes* e quesos frescos de producción artesanal que se expanden en los mercados del distrito de Ica, enero-marzo 2003. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, Lima, v. 21, n. 2, p. 71-75, Enero., 2004.

FARBER, J. M. ; GENDEL, S. M.; TYLER, K. D.; BOERLIN, P.; LANDRY, W. L.; FRITSCHER, S. J.; BARRET, T. J. Molecular typing and differentiation. In: DOWNES, F.P.; ITO, H. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological**

examination of foods. 4th ed. Washington D. C.: American Public Health Association, 2001. Chap. 11, p. 127-156.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F de; NASSU, R. T; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. suplemento, p. 162-165 dez., 2003.

FENG, P.; WEAGANT, S. D. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: UNITED STATES FOOD DRUG ADMINISTRATION (Ed.). **Bacteriological analytical manual online**. 8th ed. Gaithersburg, AOAC International, 2002. Chap. 4. p. 4.1-14. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>>. Acesso em: 12 Jan. 2006.

FIGUEIREDO, E. A. T. **Ocorrência do gênero *Listeria* e avaliação da diversidade genética de *Listeria monocytogenes* através do rondam amplified polymorphic DNA (RAPD) e sua distribuição em uma linha de processamento de leite pasteurizado tipo C**. 2000. 100p. Tese (Doutor em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

FITZGERALD, J. R.; MONDAY, S. R.; FOSTER, T. J.; BOHACH, G. A.; HARTIGAN, P.J.; MEANEY, W.J.; SMYTH, C. J. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 1, p. 63-70, Jan., 2001.

FLEMING, D. W.; COCHI, S. L.; MACDONALD, K. L.; BRONDUN, J.; HAYES. P. S.; PLIKAYTIS, B. D.; HOIMES, M. B.; AUDURIER. A.; BROOME, C. V.; REINGOLD, A. L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of

listeriosis. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 312, n. 7, p. 404-407, Jan., 1985.

FLINT, J. A.; VAN DUYNHOVEN, T. Y.; ANGULO, F. J.; DELONG, S. M.; BRAUN, P.; KIRK, M.; SCALLAN, E.; FITZGERALD, M.; ADAK, G.; SOCKETT, P.; ELLIS, A.; HALL, G.; GARGOURI, N.; WALKE, H. Estimating the burden of acute gastroenteritis, foodborne disease, and pathogens commonly transmitted by food: an international review. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 41, n. 1, p. 698-704, Sept., 2005.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) / WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Statistical information on food-borne disease in Europe microbiological and chemical hazards. In: PAN-EUROPEAN CONFERENCE ON FOOD SAFETY AND QUALITY, 1, 2002, Budapest. [**Proceeding**]. Roma: WHO, 2002. 15p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/004/y369e/y369e00.pdf>. Acesso em: 17 Jul. 2006.

FREITAS, E. I. **Detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus* sp. isolados de queijo Minas Frescal**. 2005. 106p. Dissertação (Mestre em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

GAHAN, C. G. M.; HILL, C. A review: Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.98, n. 6, p. 1345-1353, June, 2005.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd ed., 2004.

Disponível em:

<http://141.150.157.80/bergeysoutline/outline/bergeysoutline_5_2004.pdf>

Acesso em: 15 Jan. 2006.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSHRO, P. M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **Federation of European Microbiological Societies**, Amsterdam, v. 29, n. 11, p. 851-875, Nov., 2005.

GAULIN, C.; RAMSAY, D.; RINGUETTE, L.; ISMAIL, J. First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002. **Canada Communicable Disease Report**, Quebec, v. 29, n. 21, Nov., 2003. Disponível em:

<hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/publicat/ccdr-/03vol29/dr2921ea.html>. Acesso em: 01 Mar. 2006.

GIANFRANCESCHI, M.; GATTUSO, A.; TARTARO, S.; AURELI, P. Incidence of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples in Italy between 1990 and 1999: serotype distribution in food, environmental and clinical samples. **European Journal Epidemiology**, Amsterdam, v. 18, n. 10, p. 1001-1006, Oct., 2003.

GOMBAS, D. E.; CHEN, Y.; CLAVERO, R. S.; SCOTT, V. N. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 4, p. 559-569, Apr., 2003.

GOULET, V.; JAQUET, C.; VAILLANT, V.; REBIÉRE, I.; MOURET, E.; LORENTE, C.; MAILLOT, E.; STAINER, F. ROCOURT, J. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. **The Lancet**, London, v. 345, n. 8964, p. 1581-1582, June, 1995.

GRAVANI, R. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities. In: RYSER, E.; MARTH, E.H. (Eds.). ***Listeria, listeriosis and food safety***. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker. 1999. Chap. 17, p. 657-709.

GRAVES, L. M.; HUNTER, S. B.; ONG, A. R.; SHOONMAKER-BOPP, D.; HISE, K.; KORNSTEIN, L.; DEWITT, W. E.; HAYES, P. S.; DUNNE, E.; MEAD, P.; SWAMINATHAN, B. Microbiological aspects of the investigation that traced the 1998 outbreak of listeriosis in the United States to contaminated hot dogs and establishment of molecular subtyping-based surveillance for *Listeria monocytogenes* in the PulsedNet Network. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 5, p. 2350-2355, May, 2005.

GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B.; HUNTER, S. B. Subtyping *Listeria monocytogenes*. In: RYSER, E.; MARTH, E.H. (Ed.) ***Listeria, listeriosis and food safety***. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker. 1999. Chap. 9, p. 279-298.

HAEGHEBAERT, S.; SULEM, T.; BERONDILLE, L.; VANNERROY-ADENOT, E.; BAGNIS, O.; BOUVET, P.; GRIMONT, F.; BRISABOIS, A.; LE QUERREC, F.; HERVEY, C.; ESPIÉ, E.; VALK, H.; VAILLANT, V. Two outbreaks of *Salmonella Enteritidis* phage type 8 linked to the consumption of Catal cheese made with raw milk, France, 2001. **European Communicable Disease Bulletin**, France, v.8, n.7/8, p. 151-168, July/Aug., 2003.

HEADRICK, M. L.; KORANGY, S.; BEAN, N. H.; ANGULO, F. J.; ALTEKRUSE, S. F.; POTTER, M. E.; KLONTZ, K. C. The epidemiology of raw milk- associated foodborne disease outbreaks reported in the United States, 1973 through 1992. **American Journal Public Health**, Washington, v.88, n. 8, p. 1219-1221, Aug., 1998.

HERVEY, C.; ESPIÉ, E.; VALK, H.; VAILLANT, V. Two outbreaks of *Salmonella Enteritidis* phage type 8 linked to the consumption of Catal cheese made with raw

milk, France, 2001. **European Communicable Disease Bulletin**, France, v. 8, n. 7/8, p. 151-168, July/Aug., 2003.

HILUY, D. J.; ARAÚJO, R. E. S. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos de coalho comercializados em Fortaleza – CE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 28-36, maio/abril, 1999.

HOLECKOVÁ, B.; HOLODA, E.; FOTTA, V.; KALINÁCOVÁ, V.; GONDOL, J.; GROLMUS, J. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Dublin, v. 9, n. 3, p. 179-182, Mar., 2002.

IDE, L. P. A.; BENEDET, H. D. Contribuição ao conhecimento do queijo colonial produzido na região serrana do estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1351-1358, nov./dez., 2001.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Staphylococcus aureus*. In: ICMSF. (Ed). **Microorganisms in food 5: characterization of microbial pathogens**. New York: Kluvers Academic, 1996. v. 5, Chap. 17, p. 299-333.

INSTITUTO PANAMERICANO DE PROTECCIÓN DE LOS ALIMENTOS Y ZOONOSIS (INPPAZ) / ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS) / ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Vigilancia Epidemiológica. Sistema de información regional para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos [SIRVETA]. Disponível em: <<http://www.panalimentos.org/sirveta/e/salida2.asp>>. Acesso em: 14 Jul. 2006.

JABLONSKI, L. M. ; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. 2nd ed., Washington: ASM, 2001. Chap. 19, p. 411-434.

JACQUET, C.; CATIMEL, B.; BROSCHE, R.; BUCHRIESER, C.; DEHAUMONT, P.; GOULET, V.; LEPOUTRE, A.; VEIT, P.; ROCOURT, J. Investigation related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 6, p. 2242-2246, June, 1995.

JACQUET, C.; SAINT-CLOMENT, C.; BROUILLE, F.; CATAMEL, B.; ROCOURT, J. La listériose humaine en France en 1997. Données du Centre National de Référence des Listeria. **Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire**, Paris, n. 33, p. 142-143, Oct., 1998.

JARRAUD, S.; COZON, G; VANDERNESCH, F.; BES, M.; ETIENNE, J.; LINA, G. Involvement of enterotoxin G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlat fever. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington v. 37, n. 8, p. 2446-2449, Aug., 1999.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *cgc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 166, n. 1, p. 669-677, Jan., 2001.

JENSEN, A.; FREDERIKSEN, W.; GERNE-SMIDT, P. Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989-1990. **Scandinavian Journal Infectious Diseases**, Stockholm, v. 26, n. 3, p. 171-178, Oct., 1994.

JONES, C. L.; KHAN, S. A. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 166, n. 1, p. 20-33, Apr., 1986.

JØRGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LØVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by

enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 252, n. 2, p. 267-272, 2005.

KABUKI, D. Y. **Rastreamento de *Listeria monocytogenes* em indústrias processadoras de queijo fresco tipo Latino, nos Estados Unidos da América, empregando a subtipagem molecular**. 2005. 135p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, n. 9, p. 2803-2812, Sept. 2004.

KELLS, J.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood ágar for isolation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 2 p. 167-174, Mar., 2004

KHAMBATY, F. M.; BENNET, R.W.; SHAH, D. B. Application of pulse field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. **Epidemiology and Infection**, London, v. 113, n. 1, p. 75-81, Jan., 1994.

KUHN, M.; GOEBEL, W. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. In: RYSER, E.; MARTH, E.H. (Ed.). ***Listeria*, listeriosis and food safety**. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker. 1999. Chap. 5, p. 97-130.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em

amostras de leite cru refrigerado. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária de Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 5, p. 702-709, maio, 2005.

LANGE, C.; BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F.; BRITO, J. R. F.; TAVARES, W.; CARVALHO, L. B.; MARICATO, E. Identificação de *Staphylococcus* coagulase-positivos isolados de leite cru pela técnica de PCR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo. **Anais**. Passo Fundo: Universidade Federal de Passo Fundo, 2004. p. 1-4.

LECLERC, V.; DUFOUR, B.; LOMBARD, B.; GAUCHARD, F.; GARIN-BASTUJI, B.; SALVAT, G.; BRISABOIS, A.; POUMEYROL, M.; DE BUYSER, M.L.; GNANOU-BESSE, N.; LAHELLEC, C. Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. **Livestock Production Science**, Paris, v. 76, n. 2, p. 195-202, 2002.

LEITE, C. C.; GUIMARÃES, A. G.; RIBEIRO, N. S.; ASSIS, P. N. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em queijo do tipo “coalho” comercializado em Salvador. **Revista Analítica**, Salvador, v. 2, n. 1, p. 38-41, nov., 2002.

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

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 95, n. 1, p. 38-43, Jan., 2003.

LIMA, A. F. ***Staphylococcus* coagulase positiva e enterotoxinas em queijo de coalho**. 2005. 86p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; LOU, X. D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C. ; HIRD, D. W.; YONEKURA, M. I.; HAYES, P.; WEAVER, R.; AUDURIER, A.; PLIKAYTIS, B. D.; FANNIN, S. L.; KLEKS, A.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis associated with mexican-style cheese. **New England Journal Medicine**, Boston, v. 319, n.13, p. 823-828, Sept., 1988.

LONCAREVIC, S.; JORGENSEN, H. J.; LOVSETH, A.; MATHISEN, T.; ROVIK, L. M. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 98, n. 3, p. 344-350, Mar., 2005.

LOU, Y.; YOUSEF, A. E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: RYSER, E.; MARTH, E.H. (Ed.). **Listeria, listeriosis and food safety**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker. 1999. Chap. 6, p. 131-224.

LUNDÉN, J. M.; AUTIO, T. J.; KORKEALA, H. J. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, n. E. Suppl., p. E6-11, July, 2004.

LYYTIKÄINEN, O.; AUTIO, T.; MAIJALA, R.; RUUTU, P.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; MIETTINEN, M.; HATAKKA, M.; MIKKOLA, J.; ANTTILA, V. J.; JOHANSSON, T.; RANTALA, L.; AALTO, T.; KORKEALA, H.; SIITONEN, A. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a from butter in Finland. **The Journal Infectious Diseases**, Boston, v. 181, n. 5, p. 1838-1841, May, 2000.

MACDONALD, P. D. M.; WHITWAM, R. E.; BOGGS, J. D.; MACCORMACK, J. N.; ANDERSON, K. L.; REARDON, J. W.; SAAH, J. R.; GRAVES, L. M.; HUNTER, S. B.; SOBEL, J. Outbreak listeriosis among mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 40, n. 5, p. 677-682, Mar., 2005.

MAKINO, S. I.; KAWAMOTO, K.; TAKESHI, K.; OKADA, Y.; YAMASAKI, M.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 104, n. 2 p. 189-196, Oct., 2005.

MANFREDA, G.; DE CESARE, A.; STELLA, S.; COZZI, M.; CANTONI, C. Occurrence and ribotypes of *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 102, n. 3 p. 287-293, July, 2005.

MARRACK, P.; KAPPLER, J. The staphylococcal enterotoxin and their relatives. *Science*, Washington, v. 248, n. 4956, p. 705-711, May, 1990.

MARTIN, S. E.; MYERS, E.R.; LANDOLO, J. J. *Staphylococcus aureus*. In: HUI, Y.H.; PIERSON, M.D.; GORHAM, J.R. (Ed.). **Foodborn disease handbook – bacterial pathogens**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2001. v. 1. Chap. 15. p. 345-381.

MCCARTHY, T.; PHAN, Q.; MSHAR, P.; MSHAR, R.; HOWARD, R.; HADLER, J. Outbreak multidrug-resistant *Salmonella* Newport associated com consumption of Italian-style soft cheese, Connecticut. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EMERGING INFECTIOUS DISEASES, 2, 2002, Atlanta. **Abstracts**. Atlanta: CDC, 2002. Disponível em: http://www.cdc.gov/foodnet/pub/publications/2002/mccarthy_2002.pdf. Acesso em: 17 Mar. 2006.

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

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. 1999. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infection Disease**, Atlanta, v.5, n. 5p. 607–625, Sep./Oct., 1999.

MEHROTA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W.M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, Mar., 2000.

MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P. A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, Amsterdam v. 21, n. 2, p. 213-216, Apr., 2004.

MENDES, E. S.; LIMA, E. C.; NUMERIANO, A. K. M.; COELHO, M. I. S. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e coliformes em queijos de "coalho" comercializadas em Recife. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 66/67, p. 122-126, nov./dez., 1999.

MENENDEZ, S.; GODINEZ, M. A. R.; RODRIGUEZ-OTERO, J. L.; CENTENO, J. A. Removal *Listeria* spp. In a cheese factory. **Journal Food Safety**, Tumbuil, v. 17, n. 2, p. 133-139, Sept., 1997.

MENG, J.; DOYLE, M. P.; ZHAO, T.; ZHAO, S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. 2nd ed., Washington D. C.: ASM Press, 2001. Chap. 10, p.193-213.

MEYRAND, A.; VERNOSY-ROZAND, C. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in different cheeses. **Revue Medicine Veterinaire**, Paris, v. 150, n. 7, p. 601-616, July, 1999.

MICHINO, H.; OTSUKI, K. Risk factors in causing outbreak of foodborne illness originating in school lunch facilities in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 62, n. 5, 557-560, 2000.

MONDAY, S. R.; BONACH, G. A. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 10, 4311-4314, Oct., 1999.

MUNSON, S. H.; TREMAINE, M. T. ; BETLEY, M. J.; WELCH, R. A. Identification and characterization staphylococcal enterotoxins of type G and from *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 7, p. 3337-3348, July, 1998.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D. M. S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto alegre, v. 32, n. 1, p. 47-51, jan., 2004.

NASSU, R. T.; LIMA, J. R.; BASTOS, M. S. R.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no Estado do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n. 89, p. 28-36, jul., 2001.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 11, n. 1, p.142-201, Jan., 1998.

NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES (NIID). *Staphylococcus* food poisoning in Japan. **Infectious Agents Surveillance Report**, Tokyo, v. 22, n. 8, p. 185-186, 2001.

NICOLAU, E. S.; KUAYE, A. Y.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, G. R. Avaliação do potencial de produção e tipo de enterotoxinas estafilocócicas encontradas em linhagens de *Staphylococcus aureus* em extratos de amostras de queijo tipo

mussarela fabricado na região de Goiânia - GO. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 56, n. 321, p. 92-101, jul./ago, 2001.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASLELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BALZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N. C.; CELANO, G. V. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 73-79, Jan., 2005.

NØRRUNG, B.; ANDERSEN, J. K.; SCHLUNDT, J. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 2-3 p. 195-203, Dec., 1999.

OLSEN, S. J.; MACKINON, L. C.; GOULGING, J. S.; SLUTSKER, L. Surveillance for foodborne disease outbreaks, 1992-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, n. SS01, p. 1-51, Mar., 2000.

OLSEN, S. J.; YING, M.; DAVIS, M. F.; DEASY, M.; HOLLAND, B.; LAMPIETRO, L.; BAYSINGER, C. M.; SASSANO, F.; POLK, L. D.; GORMLEY, B.; HUNG, M. J.; PILOT, K.; ORSINI, M.; VAN DUYN, S.; RANKIN, S.; GENESE, C.; BRESNITZ, E. A.; SMUCKER, J.; MOLL, M.; SOBEL, J. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium infection from milk contaminated after pasteurization. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, n. 5, p. 932-935, May, 2004.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 246, n. 2, p. 191-198, May, 2005.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin- related putative toxin encoded by to kinds of plasmids. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 6, p. 6088--6094, June, 2003.

OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; YU, S.; HU, D.L.; UEDA, S.; SHINAGAWA, K. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productive of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington v. 40, n. 3, p. 857-862, Mar., 2002.

OMORI, G.; KATO, Y. A staphylococcal food-poisoning caused by a coagulase-negative strain. **Biken's Journal**, Berlin, v.2, p. 92- 92, Jan., 1959.

ORWIN, P. M.; FITZGERALD, J. R.; LEUNG, D. Y. M.; GUTERREZ, J. A.; BOACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 2, p. 2916--2919, Feb., 2003.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D. Y. M.; DONAHUE, H. I.; NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P. M. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 3, p. 360-366, Mar., 2001.

PAIVA. M. S. D.; CARDONHA, A. M. S. Queijo de coalho artesanal e industrializado produzidos no Rio Grande do Norte. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n. 61, p. 33-37, jan./fev., 1999.

PEREIRA, M. L.; CARMO, J. S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de *Staphylococcus coagulase negativos* pauciprodutores de enterotoxinas, em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 171-175, maio/ago., 2001.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; SANTOS, E. J.; PEREIRA, J. L.; BERGDOLL, M. S. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n. 5, p. 559-561, May, 1996.

PEREIRA, M. L.; CASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W. T., FALEIRO, E. S. C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 5, p. 427-431, out., 1999.

PEREZ, R. M. **Perfil sensorial, físico-químico e funcional de queijo de coalho comercializado no município de Campinas - SP**. 2005. 122p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campina, 2005.

PERSI, J. T. M. Queijo Minas tipo frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 83, p.63-70, abr., 2001.

PIMBLEY, D. W.; PATEL, P. D. A review of analytical methods for the detection of bacterial toxins, **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, London, v. 84, n. S1, p. 98S-109S, July, 1998.

PINTADO, C. M. B. S.; OLIVEIRA, A.; PAMPULHA, M. E.; FERREIRA, M. A. S. S. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. **Food Microbiology**, Amsterdam v. 21, n. 2, p. 213-216, Apr., 2004.

PINTO, M. S. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros químicos e microbiológicos do queijo artesanal do Serro – MG**. 2004. 158p. Dissertação (Mestre em Ciência e tecnologia de Alimentos) – Departamento de tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

PRITCHARD, T. J.; FLANDERS, K. J.; DONELLY, C. W. Comparison of incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 26, n. 3 p. 375-384, Aug., 1995.

RAMOS, S. N. M.; COSTA, C. A. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus – MA, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 33, n. 4, p. 613-618, out./dez., 2003.

RAPINI, L. S.; FEIJÓ, L. D.; VERAS, J. F.; NASCIMENTO, K. F.; AMADO, J. B.; COUTO, I. P.; CARMO, L. S.; SILVA, M. C. C.; CERQUIRA, M. M. O. P. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Listeria* sp. e *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo tipo coalho. **Revista do Instituto de laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 60-65, jul./ago., 2002.

RATNAM, S.; STRATTON, F.; O'KEEFE, C.; ROBERTS, A.; COATES, R. *Salmonella* Enteritidis outbreak due to contaminated cheese – Newfoundland. **Canada communicable Disease Report**, Ottawa, v. 25, n. 3, p. 17-19, Feb., 1999.

REIBNITZ, M.; GARCÍA, T. L. J. Presencia de coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* coagulase y DNasa positivos en queso "colonial" comercializado en el municipio de Blumenau, Estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista Argentina Microbiologia**, Buenos Aires, v. 30, n. 1, p. 8–12, ENE./mar., 1998.

REISER, R. F.; ROBBINS, R.N.; NOLETO, A. L.; KHOE, G.P.; BERGDOLL, M. S. Identification, purification, and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C₃. **Infection and Immunity**, Washington, v. 45, n. 3, p. 625-630, Sept., 1984.

REN, K.; BANNAN, J. D.; PANCHOLI, V.; CHEUNG, A. L.; ROBBINS, J. C.; FISCHETTI, V. A.; ZABRISKIE, J. B. Characterization and biological properties of a new staphylococcal enterotoxin, **The Journal Experimental of Medicine**, New York, v. 180, n. 5 , p. 1675-1683, Nov., 1994.

RIJPENS, N. P.; HERMAN, L. M. F. Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 85, n. 4, p. 984- 995, Jun./July, 2002.

RODRIGUEZ, L.; NUNEZ, F.; CORDOBA, J. J.; BERMUDEZ, E.; ASNSIO, M. A. Gram-positive, catalase cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 6, p. 1897-1902, June, 1996.

ROSEC, J. P.; GUIRAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 77, n. 1/2, p. 61-70, Jan./Feb. 2002.

ROSEC, J. P.; GUIRAUD, J. P.; DALET, C.; RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 213-221, mar. 1997.

RUDOLF, M.; SCHERER, S. Incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 63, n. 1-2 p. 91-98, Jan., 2001.

RYSER, E. T. Incidence and behaviour of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. In: RYSER, E.; MARTH, E.H. (Ed.). **Listeria, listeriosis and food safety**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker. 1999. Chap. 12, p. 411-358.

SABIONI, J. G.; HIROOKA, E.L.; SOUZA, M.L.R. Intoxicação alimentar por queijo “Minas” contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista da Saúde Pública**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 458-461, 1988.

SABIONI, J. G.; NASCIMENTO, D.; PEREIRA, J. L. intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo “Minas” em Ouro Preto, Minas Gerais, 1992. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 8, n. 33, p. 22-23, jan., 1994.

SALTIJERAL, J. A.; ALVAREZ, V. B.; GARCIA, B. Presence of *Listeria* in Mexican cheeses. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 19, n. 4, p. 241-247, Dec., 1999.

SANTOS, F. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; CUNHA, G. M. A. Aspectos microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em Fortaleza – Ceará. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 13, n. 1, p. 31-61 jan./jun., 1995.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 1, p. 14-56, Jan., 2004.

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA (SDA). Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de manteiga da terra, queijo de coalho e queijo de manteiga. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 16 jul. 2001a. Disponível em:

<<http://200.252.165.21/sda/dipoa/instnorm30aiirtqueijomanteiga.htm>>.

Acesso em: 28 jan. 2006.

SENA, M. J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp. isolados de queijos de coalho comercializados em Recife-PE**. 2000. 75p. Tese (Doutora em veterinária) - Faculdade de veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F.
Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 241-248, Mar., 2003.

SILVA, M. C. D.; DESTRO, M. T.; HOFER, E.; TIBANA, A. Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from brasilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping techniques. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 63, n. 3, p. 275-280, Feb., 2001.

SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 3, p. 354-356, Mar., 1998.

SILVA, C. C.; RODRIGUES, M. M.; MARTINS, B. R.; EDUARDO, M. B. P.; BASSIT, N. P.; CÉSAR, M. L. V. S.; KATO, M. A. M.; FERNADES, S. A.; THIAGO, C.; PIMENTEL, E. P.; PAVANELLI, E. I.; COLLEONE, R. P.; VIGILATO, M. A. N.; RANDI, A.P. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* em, São Paulo/ sp., Setembro de 2004. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 1, n.11, p. 1-8, set, 2004. Disponível em:
<http://www.cve.saude.sp.gov.br/bepa11_salmo.htm>. Acesso em: 07 abr. 2006.

SORIANO, J. M.; FRONT, G.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 60-67, Feb., 2002.

SOUSA, R.A. **Incidência de *L. monocytogenes* em queijo tipo coalho artesanal comercializado à temperatura ambiente em Fortaleza - CE**. 2002. 78p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, 2002.

SOUSA, S. **Ocorrência de *Listeria* spp. em queijo de massa crua tipo coalho, comercializado no município de João Pessoa – PB.** 1999. 120p. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1999.

SUTHERINAD, P.; PORRIT, R. Dissemination and ecology of *Listeria monocytogenes* in Australia dairy factory environment. **Food Australia**, Waterloo, v. 48, n. 4, p.172, 174-176, 178, Apr., 1996.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p. 1438-1443, Apr., 1995.

SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. 2nd ed., Washington D. C.: ASM, 2001. Chap. 18, p. 383-409.

TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A. D., GARRITY G. M.; EUZÉBY J. P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, n. 1, p.521-524, Jan., 2005.

TOMPKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 4, p. 709-725, Nov., 2002.

UDO, E. E.; AL-BUSTAN, M. A.; JACOB, L. E.; CHUGH, T. D. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait city may be a potential causal of food poisoning. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 48, n. 9, p. 819-823, Sept., 1999.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Economic Research Service. Economics of foodborne disease: food and pathogens. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/Briefing/FoodboeneDisease/foodandpathogens.htm>>. Acesso em: 12 Maio 2006.

VAILLANT, V.; HAEGHEBAERT, S.; DESENCLOS, J. C.; BOUVET, P.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A.; BURNENS, A. P. Outbreak of *Salmonella* dublin infection in France, November - December 1995. **Euro Surveillance**, Paris, v. 1, n. 2, p. 9-10, Aug., 1996.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUES-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 3, p. 584-640, July, 2001.

VERAS, J. F.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; FERNANDES, T. M. G.; AZALIM, C. C.; SILVA, M. C. C.; MARTNS, R. T.; CERQUEIRA, M. M.O.P. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n. 104/105, p. 218-119, jan./fev., 2003.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PERRIN, G.; HAOND, F.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Identification *Micrococcaceae* isolated from goat's milk and cheese in the Poitou-Charentes region. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 373-378, Mar., 1996a.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococcal isolated from goats and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 271-280, Mar., 1996b.

VILLAR, R. G.; MACEK, M. D.; SIMONS, S.; HAYS, P. S.; GOLDOFT, M. J.; LEWIS, J. H.; ROWAN, L. L.; HURSH, D.; PATNODE, M.; MEAD, P.S. Investigation of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Washington, State. **The Journal of the American Medical association**, Chicago, v. 281, n. 19, p. 1811-1816, May, 1999.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 7, p. 3366-3370, July, 2002.

WERBER, D.; DREESMAN, J.; FEIL, F.; VAN TREECK, U.; FELL, G.; ETHELBRG, S.; FISHER, I. S. T.; BEHNKE, S. C.; BARTELT, E.; WEISE, E.; ELLIS, A. SIITONEN, A.; ANDERSON, Y; TSCHÄPE, H.; KRAMER, M. H.; AMMON, A. International outbreak of Salmonella Orangeburg due to German chocolate. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 5, n. 7, p. 1-10, Feb., 2005.

WIEDMANN, M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 85, n. 2, p. 524-531, Mar./Apr., 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Food safety and foodborne illness**. Geneva: World Health Organization, Fact sheet, nº 237, Jan., 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html>>. Acesso em: 05 Fev. 2006.

YARWOOD, J. M.; MCCORMICK, J. K.; PAUSTIAN, M. L.; ORWIN, P. M.; KAPUR, V.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization and Expression Analysis of Staphylococcus aureus Pathogenicity Island 3: implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. **Journal Biological Chemistry**, v. 277, n. 15, p. 13138-13147, April, 2002.

ZHANG, S.; IANDOLO, J. J.; STEWART, G. C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 168, n. 2, p. 227 -233, Nov., 1998.

ZIPRIN, R. L.; HUME, M. H. Human salmonellosis: general medical aspects. In: HUI, Y.H.; PIERSON, M.D.; GORHAM, J.R. (Ed.). **Foodborne disease handbook**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2001. v. 1, Chap. 13, p. 285- 321.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR COLIFORMES FECAIS, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* E *Salmonella* sp. EM UMA INDÚSTRIA PROCESSADORA DE QUEIJO DE COALHO

Avaliação da contaminação por coliformes fecais, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. em uma indústria processadora de queijo de coalho

RESUMO

O perfil de contaminação por coliformes fecais, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* foi avaliado em uma linha de produção de queijo de coalho, de uma indústria de laticínios situada em Fortaleza, CE. Um total de 100 amostras de alimentos, incluindo leite cru, leite pasteurizado, coalhada, queijo e, 165 amostras ambientais, incluindo ar ambiente, superfícies de equipamentos, móveis, utensílios, drenos, pisos e paredes, foram coletadas de cinco processamentos (lotes) diferentes. Todas as amostras foram analisadas quanto à presença de *L. monocytogenes*, enquanto as amostras de alimentos, também, foram analisadas quanto ao número mais provável de coliformes totais e fecais, presença de *E. coli* e *Salmonella* spp. Os isolados característicos do gênero *Listeria* foram identificados utilizando-se o kit *API*[®] *Listeria* e por meio da amplificação de fragmentos dos genes *hly* e *actA*, utilizando a técnica PCR. O leite cru apresentou elevada população de bactérias do grupo coliformes totais e fecais, com confirmação da presença de *E. coli*, evidenciando deficiências nas condições higiênico-sanitárias, durante o processo de obtenção do leite. A presença de *E. coli* não foi constatada no leite pasteurizado, na coalhada e no queijo. Os níveis de coliformes fecais detectados nos queijos apresentaram-se superiores ao limite legal estabelecido para queijo de média umidade (10^3 NMP/mL) em apenas um lote. Em 100% das amostras dos alimentos analisadas verificou-se ausência de *Salmonella* spp. A identificação de 18 isolados característicos do gênero *Listeria* através do kit *API*[®] *Listeria* revelou três isolados como sendo *L. monocytogenes* “atípicas”. Estas não apresentaram amplificação dos fragmentos específicos para os genes *hly* e *actA*, destacando assim a possível ausência desta espécie de microrganismo no ambiente de produção de queijo de coalho da indústria avaliada.

Palavras chave: produtos lácteos, qualidade, microbiologia, patógenos.

1. INTRODUÇÃO

O queijo de coalho, produzido em todos os estados do Nordeste, é um dos produtos lácteos mais difundidos no estado do Ceará. No entanto, por ser elaborado, na maioria das vezes, a partir de leite cru e sob condições insatisfatórias de higiene, em propriedades rurais ou em pequenas indústrias que não adotam as Boas Práticas de Fabricação, não apresenta segurança microbiológica e padronização da qualidade.

Os estudos sobre avaliação microbiológica de queijo de coalho produzido em vários estados do Nordeste, especialmente os artesanais, em sua maioria, têm evidenciado altos índices de contaminação por coliformes fecais e *E. coli* (FLORENTINO; MARTINS, 1999; PAIVA; CARDONHA, 1999; BORGES *et al.*, 2003; FEITOSA *et al.*, 2003; BRUNO *et al.* 2005), excedendo os limites estabelecidos pela legislação (ANVISA, 2001).

A ocorrência de *L. monocytogenes* em leite e produtos lácteos tem sido relatada em estudos realizados em diversos países (RYSER, 1999;; KABUKI *et al.*, 2004; AYGUN; PEHLIVANLAR, 2006; COLAK *et al.*, *in press*). Entre os produtos lácteos, os queijos são os mais comumente contaminados por esta bactéria, principalmente os de alta e média umidade. No Brasil, a ocorrência de *L. monocytogenes* tem sido relatada em queijos tipo Minas frescal artesanal, Minas frescal industrial, Minas padrão artesanal e industrial, queijo de coalho artesanal e industrial, ricota, entre outros, sendo a maior ocorrência em queijo Minas frescal (SILVA; HOFER; TIBANA, 1998; CATÃO; CEBALLOS, 2001; BORGES *et al.*, 2003; CARVALHO, 2003; ESPER, 2006).

A incidência de *L. monocytogenes* em queijo de coalho apresenta ampla variação (zero a 50%), tanto para queijos artesanais como para industrializados. A maior taxa (50%) de ocorrência do patógeno foi observada em queijos de coalho artesanais (15/30) comercializados em João Pessoa (SOUSA, 1999). Cabe

ressaltar que, em outro estudo, Catão e Ceballos (2001) constataram alta incidência (51,5%) de *L. monocytogenes* em leite cru (17/45) procedente de três municípios do estado da Paraíba. No Ceará, a maior ocorrência de *L. monocytogenes* (19%) foi constatada em queijo de coalho industrializado (16/84) armazenado sob refrigeração (BRANCO *et al.*, 2003). Já em queijos artesanais elaborados a partir de leite cru, a prevalência desta bactéria foi baixa (zero a 2,3%) (BORGES *et al.*, 2003; BRANCO *et al.*, 2003; BRUNO *et al.*, 2005).

Surtos e casos esporádicos de listeriose causados por alimentos ainda não foram descritos no Brasil, embora a ocorrência de *L. monocytogenes* tenha sido relatada em vários tipos de alimentos.

A ocorrência de *Salmonella* spp. em alimentos é mundial sendo, portanto, um dos principais agentes microbianos envolvidos em surtos de DTA (CAETANO; SALTINI; PASTERNAK, 2004; DALTON *et al.*, 2004; CDC, 2005; COLAK *et al.*, *in press*). Grande parte dos surtos está associada ao consumo de produtos de origem animal como, aves, ovos, carnes, leite e produtos lácteos.

Em produtos lácteos, leite e queijos têm merecido destaque como veículo de *Salmonella*. Na Itália, Busani e outros (2005) avaliaram a prevalência de *Salmonella* em vários tipos de alimentos de origem animal e constataram a presença de *Salmonella* em 2,2% das amostras (1.576/71.643). O patógeno foi detectado em 1,1% das amostras de queijos. Na Turquia, Colak e outros (*In press*) analisaram 250 amostras de queijo Tulum, elaborado a partir de leite cru, e observaram prevalência de *Salmonella* spp. em 2,4% dos queijos. No Brasil, há vários relatos sobre a ocorrência de *Salmonella* spp. em queijos, principalmente em queijo de coalho artesanal (NASSU *et al.*, 2001; RAPINI *et al.*, 2002; ARAÚJO *et al.*, 2004).

A presença de *Salmonella* em queijo de coalho tem sido relatada em pesquisas realizadas em vários estados do Nordeste. No Ceará, Borges e outros

(2003) detectaram a presença de *Salmonella* spp. em 34,9% (15/43) das amostras de queijo analisadas. Em outro estudo, Bruno e outros (2005) verificaram que esta bactéria estava presente em 12,5% (1/8) dos queijos. Feitosa e outros (2003) relataram a presença de *Salmonella* em 9% (1/11) dos queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. Leite Júnior e outros (2000) constataram que 50% das amostras de queijo de coalho comercializadas em Campina Grande - PB estavam contaminadas com *Salmonella*, enquanto Florentino e Martins (1999) observaram contaminação em 30% (12/40) das amostras de queijo artesanal produzido em várias regiões da Paraíba. Em Recife, Mendes e outros (1999) avaliaram 105 amostras de queijo de coalho, procedentes de 15 municípios de Pernambuco, e verificaram a presença de *Salmonella* em 73,3% (77/105) dos queijos, enquanto Escobar e outros (2001) isolaram em apenas 8,7% dos queijos (2/23) produzidos em 10 microempresas do Sertão e Agreste pernambucano, e Duarte e outros (2005) em apenas 5,5% dos queijos (7/127) comercializados em 21 municípios do Estado.

Surtos de salmonelose atribuídos ao consumo de leite e produtos lácteos são relatados em vários estudos (EL-GAZZAR; MARTH, 1992; DESENCLOS *et al.*, 1996; HEADRICK, *et al.*, 1998; OLSEN *et al.* 2000; FAO/WHO, 2002).

Nos Estados Unidos, no período de 1973 a 1992, foi relatado pelo CDC um total de 32 surtos associados ao consumo de queijos, sendo que 11 surtos foram causados por queijo manufaturado a partir de leite cru ou leite submetido à pasteurização insuficiente (ALTEKRUSE *et al.*, 1998). Em período subsequente (1993 a 1997), OLSEN *et al.* (2000) verificaram a ocorrência de 2.751 surtos de doenças veiculadas por alimentos no País. *Salmonella* foi agente etiológico em 50,9% dos surtos e apenas 14 surtos foram veiculados por leite e derivados. Na Argentina, entre 1993 e 2001, foram descritos 39 surtos de DTA. *Salmonella* foi o agente etiológico mais freqüente (38%) e o queijo foi veículo de 10 % dos surtos (DI PIETRO *et al.*, 2004). No período de 1993 a 1998, foram investigados mais de 30.000 surtos de DTA, em 42 países da Europa. *Salmonella* spp. foi o agente

causal mais freqüente (77,1%) dos surtos. O sorotipo *S. Enteritidis* foi confirmado em 35% dos surtos, o sorotipo *S. Typhimurium* em 3%; e outros sorotipos em 3%. Leite e produtos lácteos foram veículos de *Salmonella* em 8% dos surtos (FAO/WHO, 2002).

No Brasil, Carmo e outros (2005) avaliaram o perfil epidemiológico dos surtos de DTA, no período de 1999 a 2004, e constataram notificação de 3.064 surtos. *Salmonella* sp. foi o agente etiológico mais freqüente, sendo detectada em 41% dos surtos. No Rio Grande do Sul, no período de 1997 a 1999, leite e produtos lácteos foram veículos de 2,9% dos 116 surtos de DTA causados por *Salmonella* (COSTALUNGA; TONDO, 2002). No ano subsequente (2000), 1,3% (1/74) dos surtos causados por esta bactéria foram atribuídos ao consumo de risoto com queijo (NADVORNY; FIGUEIREDO; SCHMIDT, 2004). Em São Paulo, em 2004, consumo de sanduíche de tomate seco com queijo branco contaminado por *S. Typhimurium* causou um surto de salmonelose (SILVA *et al.*, 2004).

Embora sejam numerosos os trabalhos publicados que indicam a importância de *Salmonella* sp. como problema de saúde pública no Brasil e, a grande ênfase dada pelo Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica de surtos de DTA, ainda são escassos os dados sobre a situação da salmonelose a nível nacional.

Sabe-se, também, que *Salmonella* mantém-se viável em queijo contaminado por longo período de tempo (MODI *et al.*, 2001). Tal fato ressalta a importância do controle de qualidade microbiológica do produto, visto que a legislação brasileira (ANVISA, 2001) estabelece ausência dessa bactéria em alimentos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de contaminação por coliformes fecais, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* em uma linha de produção de queijo de coalho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Processamento do queijo de coalho

O trabalho foi realizado em uma indústria processadora de queijo de coalho situada na região metropolitana de Fortaleza, Ceará, cujo fluxograma de processamento é apresentado na **Figura 1**. Os pontos de coleta de amostras com a mesma denominação, a exemplo de parede, foram numerados com algarismos romanos (I, II, III e IV) de acordo com a localização na planta de processamento. As luvas utilizadas pelos manipuladores receberam numeração de 1 a 3.

O leite foi pasteurizado a 75-78°C por 15 segundos e adicionado de fermento láctico (0,01g/L) (*EZAL*, *MAO11 - Rhodia*), cloreto de cálcio (0,01g/L) (*Labsynth*) e coalho líquido (0,3mL/L) (Bela vista). A coagulação ocorreu entre 30-40 minutos a 32-35°C, após o corte fez-se a mexedura por 18-22 minutos e procedeu-se a primeira dessoragem (retira-se 30-35% do soro). A massa foi aquecida até 44-46°C com aplicação de vapor indireto (tanque com parede dupla) e agitação por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, procedeu-se a segunda dessoragem e a salga (0,6% de cloreto de sódio). A massa foi enformada e submetida à pré-prensagem (20 minutos), seguida de viragem e prensagem (3-5 horas). O queijo foi retirado da forma e maturado a 10°C por 5-8 dias. Após a maturação foi embalado e armazenado a 10°C.

2.2. Coleta das amostras

As amostras foram tomadas em diversas etapas do processamento, conforme descrito na **Figura 1**, de cinco lotes diferentes do produção (I, II, III, IV e V), a intervalos de 45-50 dias, no período de maio a outubro de 2004. As amostras incluíam leite cru, leite pasteurizado, coalhada, queijo, ar ambiente, superfícies de equipamentos, móveis, utensílios, luvas utilizadas pelos manipuladores, embalagem de polietileno e do ambiente de processamento, provenientes de 37

pontos na linha de produção (**Figura 1**). Também foram tomadas três amostras da água utilizada na planta, para os cinco processamentos (lotes). Após cada coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas, contendo gelo, e transportadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza – CE, para análises microbiológicas de coliformes totais, coliformes fecais e *E. coli*, pesquisa de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp.

Para os equipamentos, móveis e utensílios, foi amostrada uma área de 100cm², com auxílio de esponjas de celulose estéreis (*Nasco*). Umidecidas com 10mL de água peptonada tamponada com neutralizante (tiosulfato de sódio), contidas em bolsas de polietileno estéril (*Nasco*). Em seguida, alíquotas de 100mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* – *LEB* (*Difco*) foram adicionadas às bolsas, as quais foram homogeneizadas manualmente e incubadas a 30°C por 24-26 e 48 horas. A partir dessa etapa, seguiu-se procedimento do item 2.4. Amostras do ar ambiente das salas de coagulação e enformagem, maturação, embalagem e estocagem foram tomadas com auxílio do amostrador de ar *MAS* (modelo *MAS-100Eco* – *Merck*), através da impactação de partículas sobre placa contendo meio de cultura específico. A presença de *L. monocytogenes* foi avaliada em 500 litros (0,50m³) de ar, utilizando placas de ágar Oxford – *OXA* (*Difco*) e ágar *PALCAM* (*Difco*) incubadas a 35°C por 48 horas. A partir dessa etapa, seguiu-se procedimento do item 2.4.

2.3. Determinação de coliformes totais, coliformes fecais e detecção de *E. coli*

A determinação de coliformes totais, coliformes fecais e a pesquisa de *E. coli* foi realizada em um total de 100 amostras dos produtos: leite cru, leite pasteurizado, coalhada e queijo através da técnica do Número Mais Provável (NMP) de três tubos múltiplos, segundo recomendações da *Food and Drug Administration* - *FDA* (FENG; WEAGANT, 2002). Para as 15 amostras de água

utilizou-se técnica do NMP de dez tubos múltiplos, segundo recomendações da *American Public Health Association - APHA* (KIM; FENG, 2001).

Fluxograma	Pontos de coleta (N° total de amostras)
Recepção do leite ↓	1 - Leite cru (25); 2 - Parede do tanque (05);
Pesagem / Filtração ↓	
Aquecimento (35°C) ↓	
Pasteurização ↓	3 - Leite pasteurizado (25); 4 - Tubulação pasteurizador (05);
Adição de fermento / CaCl ₂ ↓	
Adição de coalho ↓	5 - Homogeneizador (05);
Coagulação ↓	6 - Tanque de coagulação (05); 7 - Ar ambiente I (05);
Corte da coalhada / Repouso ↓	8 - Lira de corte vertical (05); 9 - Lira de corte horizontal (05);
Mexedura ↓	10 - Garfo / (05);
Primeira dessoragem ↓	11 - Mangueira (05); 12 - Cilindro (05); 13 - Piso I (05); 14 - Parede I (05);
Mexedura da massa ↓	
Segunda dessoragem ↓	15 - Coalhada (25);
Salga ↓	
Enformagem ↓	16 - Mesa de enformagem (05); 17 - Forma (05); 18 - Dessorador (05); 19- Luva 1 (05);
Pré-prensagem / Viragem ↓	20 - Luva 2 (05);
Prensagem ↓	21 - Piso II (05);
Maturação ↓	22 - Prateleira I (05); 23 - Piso III (05); 24 - Parede II (05); 25 - Ar ambiente II (05);
Embalagem ↓	26 - Embalagem (05); 27- Luva 3 (05); 28 - Prateleira II (05); 29 - Piso IV (05); 30 - Parede III (05); 31 - Ar ambiente III (05);
Queijo de Coalho ↓	32 - Queijo (25);
Estocagem	33 - Prateleira III (05); 34 - Piso V (05); 35 - Parede IV (05); 36 - Ar ambiente IV (05); 37 - Piso plataforma (05);

Figura 1. Fluxograma de processamento do queijo de coalho, pontos de coleta e número de amostras coletadas para pesquisa de *L. monocytogenes*.

Para o teste presuntivo, diluições apropriadas das amostras de produtos foram preparadas e alíquotas foram inoculadas em caldo lauril sulfato triptose - *LST* simples (*Difco*) e para as amostras de água fez-se a inoculação direta de 10mL em cada tubo de *LST* com concentração dupla. Os tubos foram incubados a 35°C durante 24-48 $\pm$ 2°C horas e examinados quanto ao crescimento e produção de gás. Em seguida, as culturas positivas foram inoculadas em caldo verde brilhante bile 2% - *BVB* (*Difco*), incubadas a 35°C durante 24-48 $\pm$ 2°C horas e examinadas quanto ao crescimento e produção de gás. O NMP de coliformes totais (NMP/mL ou g) foi determinado com base na proporção de tubos que confirmaram a produção de gás do teste presuntivo, empregando-se tabela apropriada. As culturas do caldo *LST* que também apresentaram crescimento com produção de gás em caldo *BVB*, foram inoculadas em caldo *Escherichia* - *EC* (*Difco*), incubadas a 45,5 $\pm$ 0,2°C durante 24 $\pm$ 2°C horas e examinados quanto à produção de gás para confirmação de coliformes fecais. As culturas positivas em caldo *EC* foram estriadas em ágar eosina azul de metileno – *EMB* (*Difco*), incubadas a 35 $\pm$ 2°C durante 24 horas e o crescimento de colônias típicas de *E. coli* foi observado para confirmar a presença de *E. coli*. As colônias típicas foram estriadas em ágar para contagem padrão – *PCA* (*Difco*) e incubadas a 35 $\pm$ 2°C durante 24 horas. A partir das culturas puras em *PCA*, fizeram-se a coloração de Gram e as provas bioquímicas de indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato (IMVC).

2.4. Detecção de *L. monocytogenes*

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi realizada em 265 amostras no total, sendo 100 dos produtos: leite cru, leite pasteurizado, coalhada, queijo e 165 amostras ambientais: ar ambiente, superfícies de equipamentos, móveis, utensílios, luvas utilizadas pelos manipuladores, embalagens de polietileno, drenos, pisos e paredes. As amostras foram analisadas conforme metodologia do *Health Products and Food Branch of Health Canada* (PAGOTTO *et al.*, 2001). Alíquota de 25 g de cada amostra foi homogeneizada em *Stomacher*

(Seward Ltd., London) em 225 mL de caldo *LEB* e incubada a 30°C por 24-26 e 48 horas. Após cada período de incubação, 0,1 mL da cultura foi inoculada em 10 mL de caldo Fraser modificado – *MFB* (*Difco*) e incubado a 35°C por 24 e 48 horas. Opcionalmente, após cada período de incubação a cultura do caldo *LEB* foi estriada em placas de ágar *OXA* e ágar *PALCAM* e incubadas a 35°C por 48 horas. Após cada período de incubação do caldo *MFB*, 0,1mL da cultura foi inoculada em ágar *OXA* e ágar *PALCAM* e incubadas a 35°C por 48 horas. Opcionalmente, a cultura do caldo *MFB* que não apresentou redução da esculina, também foi estriada em placas de ágar *OXA* e ágar *PALCAM* e incubadas a 35°C por 48 horas. Cinco colônias típicas de cada placa de *OXA* e ágar *PALCAM* foram purificadas em ágar de tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura – *TSAYE* (*Merck*) e estocadas a 4°C para identificação bioquímica e molecular.

A identificação bioquímica dos isolados foi realizada através de testes fisiológicos e bioquímicos (reação de Gram, catalase, motilidade e β -hemólise) e os isolados característicos do gênero *Listeria* foram selecionados para identificação através do sistema *API[®] Listeria* (*BioMérieux[®]*, Marcy-l'Etoile - France), conforme instruções do fabricante.

Para confirmar a identificação bioquímica, os 18 isolados característicos de *Listeria* sp. foram submetidos à caracterização molecular, por meio da amplificação de um fragmento de 702 pares de bases do gene de virulência *hly* (listeriolisina O) e de um fragmento de 926 pares de base do gene *actA* específico da espécie, empregando-se a técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR).

Para extração do DNA foi utilizada uma colônia de cada isolado, crescida em ágar infusão de cérebro e coração - *AHI* (*Difco*) a 35°C por 24 horas e repicada em caldo infusão de cérebro e coração *BHI* - (*Difco*). Após incubação sob agitação (250 xg) a 37°C por 18-24 horas, 2,0mL da cultura foi centrifugada a 13.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas com 95 μ L

de tampão PCR (1X), tratadas com 4µL de lisozima (50mg/mL) à temperatura ambiente por 15 minutos e então digeridas com 1µL de proteinase K (20mg/mL) a 60°C por 60 minutos, seguida de fervura por 8 minutos em banho-maria fervente (FURRER *et al.*, 1991). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (*GeneQuantpro*, Amersham Biociences) e a concentração ajustada para a reação da PCR.

A reação da PCR para amplificação do gene *hly* foi realizada em termociclador *Thermo Hybaid* (Modelo *PxE Thermal Cycler - PxE 20102*), utilizando uma mistura de 50µL contendo 1X de tampão PCR, 1,5mM de MgCl₂ (50mM), 0,1mM de cada dNTP (10mM), 1mM de cada oligonucleotídeo (LM1 - 10mM e LM2 - 10mM), 0,5U da enzima Taq polimerase, 100ng de DNA bacteriano completando-se o volume para 50 µL com água Mili-Q estéril. As condições de amplificação utilizadas foram: um ciclo inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s; anelamento a 50°C por 45s e extensão a 72°C por 45s e um ciclo final a 72°C por 5min (AZNAR; ALARÓN, 2003). No estudo foram empregados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: LM1 5'- CCT AAG ACG CCA ATC GAA - 3' e LM2 5' - AAG CGC TTG CAA CTG CTC - 3' (BORDER *at al.*, 1990).

A reação da PCR para o gene *actA* foi realizada sob condições estabelecidas por WIEDMANN *at al.* (1997), empregando-se oligonucleotídeos iniciadores *actA-F* (5'- TAG CGT ATC ACG AGG AGG-3') e *actA-R* (5'-TTT TGA ATT TCA TAT CAT TCA CC-3'). Utilizou-se uma mistura de 25µL, contendo 1X de tampão PCR, 1,5mM de MgCl₂, 0,1mM de cada dNTP, 0,12mM de cada oligonucleotídeo (*actA-F* - 12,5mM e *actA-R* - 12,5mM), 0,3U da enzima Taq polimerase, 100ng de DNA bacteriano completando-se o volume para 25,0µL com água Mili-Q estéril. As condições de amplificação utilizadas foram: um ciclo inicial a 94°C por 2 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min; anelamento a 50°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e um ciclo final a 72°C por 5 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose (1,5%,

p/v) corados com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v) e fotografados em foto documentador (Eagle Eye II, Stratagene). No estudo foram utilizadas cepas padrões de *L. monocytogenes* Scott A ATCC 15513 e *L. monocytogenes* ATCC 19118 como controle positivo da reação e *L. innocua* ATCC 33090 como controle negativo.

2.5. Detecção de *Salmonella* spp.

A presença de *Salmonella* sp. foi avaliada em 100 amostras dos produto: leite cru, leite pasteurizado, coalhada e queijo, tomadas de cinco lotes diferentes. As análises foram realizadas conforme o FDA (ANDREWS; HAMMACK, 2006) e constituiu-se das etapas de pré-enriquecimento em caldo lactosado (*Merck*) durante 24 ± 2 horas a 35°C ; enriquecimento seletivo em: a) Caldo Rappaport-Vassiliadis (*Difco*) durante 24 ± 2 horas a $42 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, b) Caldo tetracionato (*Difco*) durante 24 ± 2 horas a $43 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ para as amostras de leite cru, e a $42 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ para amostras de leite pasteurizado, coalhada e queijo, e c) Caldo selenito cistina (*Difco*) durante 24 ± 2 horas a 35°C (opcional); plaqueamento em meio seletivo diferencial (ágar bismuto sulfito, ágar xilose lisina desoxicolato, ágar entérico de *Hektoen* e ágar *Rambach* (opcional) com incubação por 24 ± 2 horas a 35°C . Após o período de incubação, selecionou-se 2-3 colônias típicas de *Salmonella* de cada tipo de meio. Na ausência de colônias típicas ou suspeitas de *Salmonella*, também foram selecionadas 2-3 colônias atípicas. Para avaliação presuntiva da presença de *Salmonella*, as colônias selecionadas foram inoculadas em ágar tríplice açúcar ferro (*Difco*) e ágar lisina ferro (*Difco*) e incubadas durante 24 ± 2 horas a 35°C .

2.6. Monitorização das condições de higiene de superfícies que contatam alimentos e do ar ambiente na linha de produção

As condições de higiene das superfícies das luvas utilizadas pelos três manipuladores, das 5 embalagens para queijo e de 15 equipamentos, móveis e utensílios da linha de produção do queijo de coalho foram monitoradas durante

todos os processamentos ou lotes (I, II, III, IV e V), através do método de detecção de ATP Bioluminescência (*Lightning MVP®* - BioControl Systems, Inc.). Neste sistema de monitoramento, o grau de limpeza da superfície é classificado com base numa escala de zero a 7,5, onde a leitura de 0 a 2 indica superfície submetida à limpeza **rigorosa**; $\leq 2,5$ superfície com higienização **adequada**; entre 2,6 e 3,0 indica **alerta** para a higienização da superfície e de 3,1 a 7,5 superfície com higienização **inadequada** (suja).

A monitorização da contaminação microbiológica do ar ambiente das salas de coagulação/enformagem, maturação, embalagem e estocagem foi realizada através da contagem de fungos e leveduras, em amostras de 200 litros ($0,20\text{m}^3$) de ar, coletadas com auxílio de um amostrador de ar (modelo *MAS-100Eco* – Merck), através da impactação de partículas sobre placas contendo ágar batata dextrosado (Merck). Após incubação das placas a 21°C por 3-5 dias, as colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC/ m^3 de ar.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da contagem de coliformes totais, coliformes fecais e da pesquisa de *E. coli* e *Salmonella* sp. em leite cru, leite pasteurizado, coalhada e queijo são apresentados na **Tabela 8**.

O leite cru apresentou elevada população de bactérias do grupo coliforme total e fecal, com confirmação da presença de *E. coli*, evidenciando contaminação da matéria prima. A presença de coliformes fecais e *E. coli* em leite cru, geralmente, é atribuída a deficiências nas condições higiênico-sanitárias, durante o processo de obtenção do leite e, indica contaminação de origem fecal. Além disso, este leite representa um risco para a saúde da população, se consumido sem tratamento térmico, pela possibilidade de veicular cepas patogênicas de *E. coli*, pertencentes aos grupos EPEC, EIEC, ETEC e EHEC.

Tabela 8. Resultados da contagem de coliformes totais e fecais e da pesquisa de *E. coli* e *Salmonella* sp. em leite e produtos lácteos de uma linha de produção de queijo de coalho.

Amostra								
Lote	Leite cru		Leite Pasteurizado		Coalhada		Queijo	
Contagem de coliformes (NMP/mL ou g)								
	Total	Fecal	Total	Fecal	Total	Fecal	Total	Fecal
I	46.000	46.000	75	43	>1100	>1100	>1100	>1100
II	7.500	4.300	15	15	150	150	210	210
III	11.000	11.000	3,6	<0,3	150	150	210	210
IV	46.000	28.000	<0,3	<0,3	150	150	3,6	3,6
V	110.000	110.000	<0,3	<0,3	23	91	930	930
Pesquisa de <i>E. coli</i>								
I	<i>E. coli</i>		ND		ND		ND	
II	<i>E. coli</i>		ND		ND		ND	
III	<i>E. coli</i>		ND		ND		ND	
IV	<i>E. coli</i>		ND		ND		ND	
V	<i>E. coli</i>		ND		ND		ND	
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.								
I	ND		ND		ND		ND	
II	ND		ND		ND		ND	
III	ND		ND		ND		ND	
IV	ND		ND		ND		ND	
V	ND		ND		ND		ND	

ND: não detectada

A contaminação de leite cru por coliformes fecais e *E. coli*, entre outros patógenos, tem sido relatada com frequência em outros estudos (GARRIDO *et al.*, 2001; DE BUYSER *et al.*, 2001; SOOMRO *et al.*, 2002). Catão e Ceballos (2001)

avaliaram 45 amostras de leite cru, provenientes de três municípios da Paraíba – PB, e verificaram alto nível de contaminação por coliformes totais, fecais e *E. coli* em 100% das amostras.

O leite pasteurizado utilizado nos processamentos (lotes) I e II apresentou contaminação por coliformes fecais, mas a presença de *E. coli* não foi confirmada. Embora o nível de contaminação constatado seja baixo (15 e 43 NMP/mL), é superior ao limite estabelecido pela legislação vigente (ANVISA, 2001). De acordo com a legislação a tolerância para este grupo de bactérias é de até 4 NMP/mL para leite pasteurizado. A presença de coliformes fecais em leite pasteurizado indica recontaminação após a pasteurização ou deficiência na pasteurização.

Níveis de contaminação por coliformes fecais, superiores ao limite estabelecido pela legislação vigente em leite pasteurizado (ANVISA, 2001), têm sido constatados em outras pesquisas. Leite e outros (2002) constataram que 35% (7/20) das amostras de leite tipo C, comercializadas em Salvador – BA, apresentavam contaminação por coliformes fecais em níveis superiores aos limites estabelecidos pela legislação. Em outro estudo, Garrido e outros (2001) analisaram 390 amostras de leite pasteurizado, provenientes de dezessete mini e micro usinas de beneficiamento, na região metropolitana de Ribeirão Preto – SP, no período de 1995 a 1998, e verificaram que 35,5% das amostras de leite tipo C, 32,6% das amostras de leite tipo B e 31,0% das amostras de leite integral apresentavam níveis de coliformes fecais em desacordo com a legislação.

Na coalhada e no queijo, o número de coliformes totais e fecais oscilou de 3,6 a >1100 NMP/g (**Tabela 8**). *E. coli* não foi detectada nas amostras de coalhada e queijo. O nível de coliformes fecais (45°C) detectado nas amostras estava dentro do limite estabelecido pela legislação (ANVISA, 2001), exceto para amostras de queijo do processamento I, as quais apresentaram níveis superiores ao padrão microbiológico para queijos de $1,0 \times 10^3$ UFC/g (ANVISA, 2001). Nas amostras dos processamentos II, III, IV e V foi observado um aumento gradativo

do NMP de coliformes fecais a partir do leite pasteurizado até o produto acabado, indicando que ocorreu contaminação durante as diferentes etapas do processo. Mas considerando a prevalência de média umidade em queijo de coalho (NASSU *et al.*, 2001; PEREZ, 2005), o NMP de coliformes fecais detectados nestes quatro processamentos encontra-se dentro do limite estabelecido pela legislação (ANVISA, 2001). O nível elevado de contaminação por coliformes fecais observado nas amostras do processamento I (coalhada e queijo) pode ser atribuído a contaminação da água utilizada na indústria, uma vez que a água analisada apresentou nível similar de contaminação (>1000NMP/100mL) por esse grupo de bactérias. A contaminação foi causada por defeito no sistema automático de cloração da água que abastece a indústria, o defeito foi reparado e as amostras de água coletadas durante os processamentos II, III, IV e V apresentaram ausência de coliformes fecais/100mL.

A ocorrência de coliformes fecais em queijo de coalho, principalmente os artesanais, em níveis superiores aos permitidos pela legislação, também tem sido observada em muitos trabalhos (FLORENTINO; MARTINS, 1999; PAIVA; CARDONHA, 1999, BRUNO *et al.*, 2005). No Rio Grande do Norte, Feitosa e outros (2003) observaram que 36% (4/11) das amostras de queijo de coalho produzido no Estado apresentavam coliformes fecais em valores superiores ao estabelecido pela legislação. Borges e outros (2003) constataram que 74,4% (32/43) das amostras de queijo de coalho artesanal e industrial, produzidos em 11 municípios do Ceará, continham níveis de coliformes fecais e *E. coli* superiores ao padrão microbiológico.

Neste trabalho *Salmonella* spp. não foram detectadas em 100% (100) das amostras analisadas (**Tabela 8**), as quais eram constituídas por leite cru, leite pasteurizado, coalhada e queijo, indicando que a linha de produção de queijo de coalho não apresentava contaminação por esta bactéria.

A presença de *Salmonella* spp. também não foi constatada em leite cru, proveniente de 210 pequenos e médios produtores, localizados nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo. (NERO *et al.*, 2004). Ávila e Gallo (1996) não isolaram esta bactéria em 57 (100%) amostras de produtos lácteos (leite cru, leite tipo C e queijo Minas frescal) comercializados no município de Piracicaba – SP. Em outro estudo, Pereira e outros (1999) avaliaram 168 amostras de queijos (Minas Padrão, Minas Frescal e Canastra) e constataram ausência do patógeno em 100% dos queijos. Em uma pesquisa conduzida por Cotton e White (1992), em seis indústrias beneficiadoras de leite e quatro produtoras de sorvete, *Salmonella* spp. estavam presentes em apenas 1,2% (4/353) das amostras ambientais.

Os resultados da identificação bioquímica e molecular dos isolados característicos do gênero *Listeria*, obtidos de leite, equipamentos, móveis, utensílios, parede, piso e ar ambiente, são apresentados na **Tabela 9** e nas **Figuras 2, 3 e 4**.

Colônias características do gênero *Listeria* foram isoladas, em amostras de apenas sete, dos 37 pontos avaliados na linha de produção do queijo de coalho (**Tabela 9**). Dentre os 77 isolados obtidos de amostras de leite cru, de equipamentos, móveis, parede e piso, 18 eram característicos de *Listeria* sp., de acordo com os testes de coloração de Gram, catalase, motilidade e β -hemólise. Observou-se que os isolados apresentaram reações muito fracas de β -hemólise, quando comparadas as das cepas padrões de *L. monocytogenes* Scott A ATCC 15313 e *L. monocytogenes* ATCC 19118.

Dentre os 18 isolados característicos, apenas três foram identificados como *L. monocytogenes* atípica pelo sistema API[®] *Listeria* (**Tabela 9**), ou seja, o perfil de identificação foi duvidoso (*doubtful profile*). Os resultados dos testes bioquímicos do API[®] *Listeria* indicaram alta probabilidade (95%) de acerto na identificação, mas baixa tipabilidade para a espécie (0,12) sendo, portanto, considerada atípica,

uma vez que *L. monocytogenes* com o perfil obtido não se encontra na base do sistema *API*[®] *Listeria*. Esse resultado demonstrou a necessidade do uso de técnicas moleculares para identificação final dos isolados de *L. monocytogenes*, com propriedades atípicas na identificação fenotípica.

Tabela 9. Perfil de identificação de isolados característicos do gênero *Listeria* obtido em uma linha de produção de queijo de coalho.

Amostra	Nº de isolados Típicos	Nº de isolados <i>Listeria</i> sp.	Espécie		
			Perfil <i>API</i> [®] <i>Listeria</i>	PCR genes	
				<i>hly</i>	<i>actA</i>
Leite cru	17	01	Não identificada	Negativo	–
Homogeneizador	16	03	Não identificada	Negativo	–
Mesa de enformagem	05	01	Não identificada	Negativo	–
Prateleira da sala de embalagem	14	04	Não identificada	Negativo	–
Prateleira da câmara de maturação	08	04	<i>L. monocytogenes</i> atípica (01)	Negativo	Negativo
Parede da câmara de maturação	05	03	<i>L. monocytogenes</i> atípica (02)	Negativo	Negativo
Piso da plataforma	12	02	Não identificada	Negativo	–

–: não realizado

Os 18 isolados característicos de *Listeria* sp. foram submetidos a técnica de PCR para avaliar a presença dos genes de virulência *hly* e *actA* e a técnica por PCR-RFLP para a subtipagem molecular. Mas não houve amplificação dos fragmentos específicos para os genes *hly* (**Figuras 2 e 3**) e *actA* (**Figura 4**) para todos os isolados. Portanto, a identificação fenotípica dos três isolados de *L. monocytogenes* atípica identificada na linha de produção, através do sistema *API*[®] *Listeria*, não foi confirmada por PCR para os genes de virulência pesquisados (**Tabela 9**). Esses resultados demonstram a importância da identificação a nível molecular para confirmação da identificação de microrganismos. Além disso,

indicam a possível ausência desta espécie de bactéria nas amostras de leite, queijo, equipamentos, móveis, utensílios e no ambiente de processamento (drenos, pisos, paredes e ar), provenientes dos 37 pontos avaliados na linha de produção do queijo de coalho.

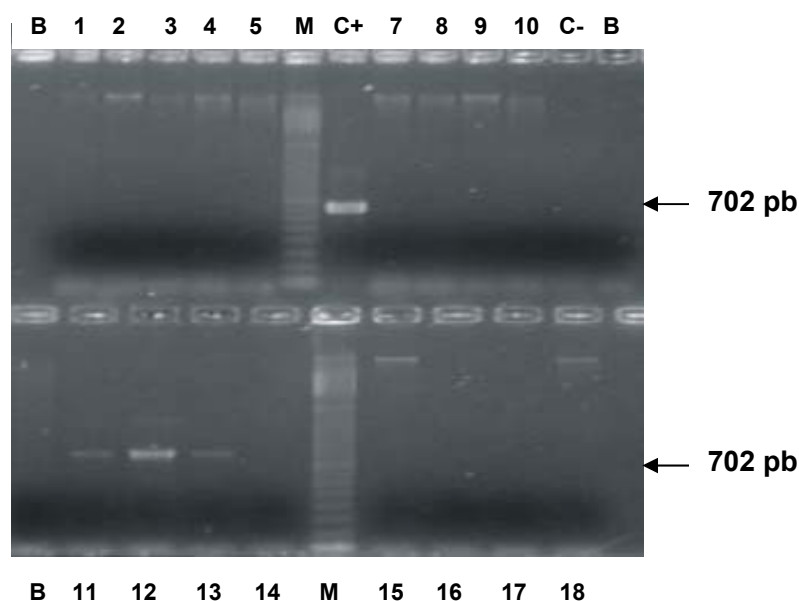


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers LM1 e LM2 para gene *hly* específico de *L. monocytogenes*. Coluna 1 a 18: isolados negativos para gene *hly*; coluna C+: Controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 15513); coluna C-: Controle negativo (*L. innocua* ATCC 33090); coluna B: controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

Feitosa e outros (2003) avaliaram a qualidade microbiológica de queijo de coalho artesanal produzido no Rio Grande do Norte e não constataram a presença de *L. monocytogenes*, embora 9% das amostras de queijos estivessem contaminadas por *Listeria* sp. Resultado similar foi observado por Bruno e outros (2005) quando pesquisaram esta bactéria em queijo de coalho artesanal e industrial comercializados em Fortaleza - CE.

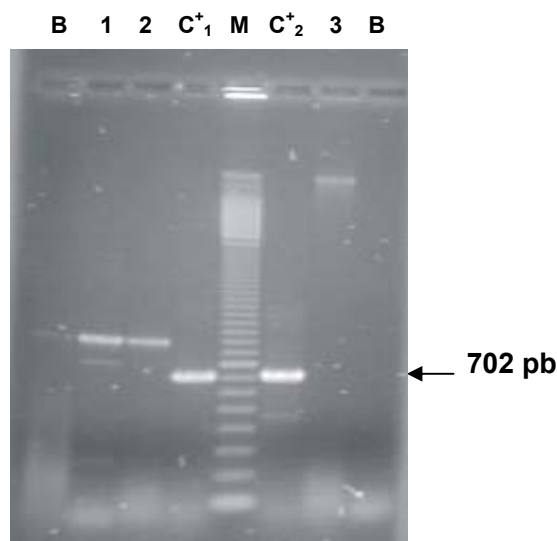


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers LM1 e LM2 para gene *hly* específico de *L. monocytogenes*. Coluna 1, 2 e 3: isolados negativos para o gene *hly*; coluna C+₁: Controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 15513); coluna C+₂: Controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 19118); coluna B: controle negativo da reação; e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

Em pesquisa semelhante realizada por Rocha (2004) em uma linha de produção de queijo Minas frescal, a presença de *L. monocytogenes* também não foi constatada na linha de produção, mesmo tendo sido observada alta prevalência de outras quatro espécies de *Listeria* em superfícies de equipamentos e de ambientes. Nero e outros (2004) não isolaram *L. monocytogenes* em leite cru, proveniente de 210 propriedades leiteiras localizadas nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo. Nos Estados Unidos, Canadá e Europa, apenas 3-4% do leite cru apresentou contaminação por *Listeria* spp. (KOZAK *et al.*, 1996). *L. monocytogenes* não foi detectada em 100% das amostras de leite (13) e queijo Minas frescal (25) estudadas por Rocha (2004). Em outro estudo, Cassarotti, Gallo e Camargo (1994) não detectaram *L. monocytogenes* em 100% (57) das amostras de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijos Minas

frescal. Em queijo mussarela de leite de búfala pasteurizado, *Listeria* spp. não foi isolado nas 72 amostras analisadas (OLIVIERI, 2004).

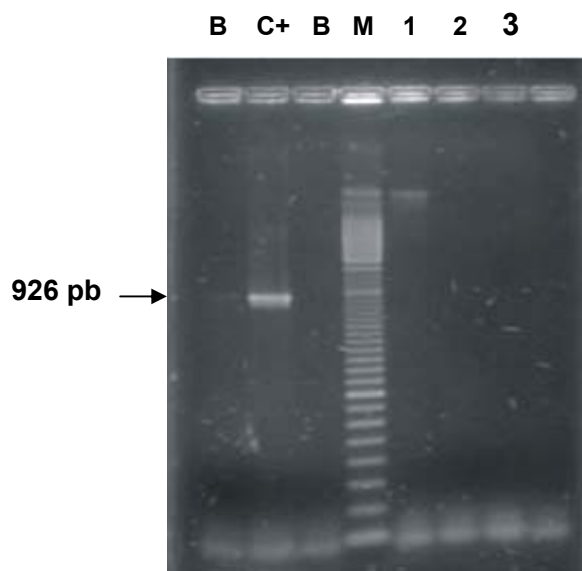


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers actA-F e actA-R para gene *actA* específico de *L. monocytogenes*. Coluna 1, 2 e 3: isolados negativos para o gene *actA*; coluna C+: Controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 15513); coluna B: controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

Nas **Tabelas 10 e 11** são apresentados os resultados da monitorização das condições de higiene das superfícies de equipamentos, móveis, utensílios, embalagem de polietileno, luvas utilizadas pelos manipuladores e do ar ambiente em uma linha de produção de queijo de coalho.

A superfície interna de 100% (5) das embalagens de polietileno avaliadas apresentou estado de limpeza rigoroso. Em todos os processamentos, o grau de higienização da superfície das luvas utilizadas pelos manipuladores foi adequado.

Tabela 10. Monitorização das condições de higiene de superfícies que contatam alimentos em uma linha de produção de queijo de coalho, pelo método ATP (Bioluminescência).

Superfícies	Lote / Grau de higienização				
	I	II	III	IV	V
Equipamento					
Tanque de recepção de leite	2,7	1,8	2,7	3,1	3,8
Tanque de coagulação	2,7	2,6	1,5	2,1	2,4
Tubulação de saída do pasteurizador	2,5	2,5	2,7	2,8	2,5
Utensílio					
Cilindro de retenção da coalhada	1,7	1,7	2,3	2,4	2,7
Dessorador de tecido	2,6	2,5	2,2	2,5	2,7
Forma	2,6	2,2	1,7	2,4	2,6
Garfo	1,8	1,6	1,7	2,3	2,7
Homogeneizador do leite	1,2	1,5	1,9	2,2	2,7
Lira de corte horizontal	2,3	2,2	1,7	2,4	2,9
Lira de corte vertical	1,8	1,8	1,6	2,3	2,7
Mangueira para drenagem do soro	3,8	2,7	1,6	2,5	2,5
Móvel					
Mesa de enformagem	2,4	2,6	2,8	2,4	4,2
Prateleira da sala de embalagem	3,7	2,9	3,6	3,0	5,1
Prateleira da câmara de estocagem	3,1	2,4	3,2	4,7	4,1
Prateleira da câmara de maturação	2,9	3,5	2,9	3,5	4,1
Embalagem					
Superfície interna da embalagem	1,9	1,9	1,6	1,7	2,0
Luva					
Luvas 1	2,2	2,5	2,0	2,4	2,5
Luvas 2	2,5	2,4	2,4	2,3	2,5
Luvas 3	2,0	1,7	2,2	2,3	2,4

Classificação do grau de higienização:

0 a 2 → Superfície submetida à limpeza **rigorosa**;

≤ 2,5 → Superfície com higienização **adequada**;

2,6 a 3,0 → **Alerta** para a higienização da superfície;

3,1 a 7,5 → Superfície com higienização **inadequada** (suja).

Em relação às superfícies dos equipamentos, móveis e utensílios da linha de produção, nenhuma apresentou grau de higienização adequado em todos os processamentos. Em 66,7% (10/15) das superfícies, o grau de higienização variou de rigoroso a adequado em três a quatro processamentos, e de estado de alerta em um ou dois. Nas superfícies dos equipamentos, móveis e utensílios como, tanque de recepção de leite cru, mangueira para drenagem do soro, mesa de enformagem, prateleiras da câmara de maturação, da sala de embalagem e da câmara de estocagem o grau de higienização foi inadequado entre um a quatro processamentos. Os resultados indicam que as condições de higienização destes equipamentos, móveis e utensílios são críticas. As prateleiras da câmara de maturação e da sala de embalagem eram de fibra de vidro (FIBRAV, Lambari - MG) e a da câmara de estocagem, de madeira, materiais estes de difícil limpeza, principalmente, quando se trata de resíduos de proteínas e gorduras.

Considerando que o método de detecção de ATP Bioluminescência é qualitativo e que mede resíduo biológico total, o grau de sujeidade observado nas prateleiras pode ser atribuído, em parte, à presença de matéria orgânica (proteínas, entre outras) e não somente de microrganismos. Procedimentos de limpeza e sanitização inadequados de superfícies de equipamentos, móveis e utensílios em indústrias de laticínios também têm sido relatados em outros estudos (MACHADO; CHAVES, 1999; CARELI *et al.*, 2003a e b, KABUKI, 2005). A obtenção de produtos lácteos seguros requer programas efetivos de higienização no contexto das Boas Práticas de Fabricação industrial.

A presença de *Listeria* spp. não foi detectada no ar dos quatro ambientes avaliados da planta de processamento, enquanto fungos e leveduras foram detectados no ar de todos ambientes analisados, cujas contagens variaram entre 280 a 750 UFC/m³ (**Tabela 11**). Estes níveis de contaminação por fungos e leveduras são similares aos relatados em outros trabalhos em indústrias de laticínios (KANG; FRANK, 1989; REN; FRANK, 1992). Em um estudo sobre a qualidade do ar ambiente, Salustiano e outros (2003) verificaram contagens de

fungos e leveduras entre 10 a 1310 UFC/m³ em diferentes áreas de uma indústria de laticínios em Minas Gerais.

Tabela 11. Monitorização da contaminação microbiológica do ar ambiente em uma linha de produção de queijo de coalho.

Ambiente	Fungos filamentosos e leveduras* (UFC/m ³)	<i>Listeria</i> spp.**
Sala de processamento	6,0 x 10 ²	ND
Sala de embalagem	7,5 x 10 ²	ND
Câmara de maturação	2,8 x 10 ²	ND
Câmara de estocagem	5,0 x 10 ²	ND

* Valores médios

** Presença ou ausência

ND: não detectada

A legislação brasileira não estabelece padrões referenciais de qualidade do ar em ambiente de processamento industrial. Mas alguns autores (KANG; FRANK, 1989), sugerem contagens entre 70-430 UFC/m³ para fungos e leveduras, de acordo com a área de processamento, outros (REN; FRANK, 1992), recomendam um limite de até 200 UFC/m³ para sala de embalagem. Para o ar Interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo, a legislação brasileira estabelece contagens de fungos menor ou igual a 750 UFC/m³ (ANVISA 2003).

4. CONCLUSÕES

O alto nível de contaminação por coliformes fecais e a presença *E. coli* constatado na matéria prima utilizada no processamento do queijo de coalho evidenciam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias na obtenção do leite. O perfil de contaminação devido a esse grupo de microrganismos se contrapõe à ausência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. nos queijos de coalho produzidos pela indústria avaliada. A utilização de técnicas moleculares (PCR)

para identificação genotípica de isolados microbianos constitui uma ferramenta útil na discriminação e rastreamento de *Listeria monocytogenes* em unidades processadoras de alimentos.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo 502929/2003-0) pelo suporte financeiro. À Embrapa Agroindústria Tropical e à Embrapa Gado de Leite pelo apoio técnico durante a execução da pesquisa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 10 jan. 2001b. Disponível em:

<<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>>. Acesso em: 07 fev. 2006.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo.

Resolução RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003. Disponível em:

<<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showct.php?id=>>>. Acesso em: 29 mar. 2006.

ALTEKRUSE, S. F.; TIMBO, B. B.; MOWBRAY, J. C.; BEAN, N. H.; POTTER, M. E. Cheese associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 7, p. 709-725, Oct., 1998.

ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. S. *Salmonella*. In: UNITED STATES FOOD DRUG ADMINISTRATION (Ed.). **Bacteriological analytical manual online**. 8th ed. Rockville: FDA, 2006. Chap. 5. p. 5.1-23. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>>. Acesso em: 22 Jun. 06.

ARAÚJO, R. A. B. M.; MARTINS, J. M.; PINTO, M. S.; OLIVEIRA, P. N.; OLIVEIRA, R. C.; FURTDO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Avaliação microbiológica do queijo artesanal da região de Araxá – MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 93-96, jul./ago., 2004.

ÁVILA, C. R.; GALLO, C. R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo c e queijo "Minas frescal" comercializados no município de Piracicaba - SP. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 53, n.1, p.159-163, Ene./Abr., 1996.

AZNAR, R.; ALARÓN, B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 958-966, Nov., 2003.

AYGUN, O.; PEHLIVANLAR, S. *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, **Turkey**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 676-679, Aug., 2006.

BORDER, P. M.; HOWARD, J. J.; PLASTOW, G. S.; SIGGENS, K. W. Detection of *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 7, p. 158-162, July, 1990.

BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, E. H. F.; FIGUEIREDO, E. A. T. Microrganismos patogênicos e em queijo de coalho produzido no Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 31-40, jan./jun., 2003.

BRANCO, M. A. A. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; BORGES, M. F.; SILVA, M. C. D.; DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 393-408, jun./dez., 2003.

BRUNO, L. M.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; CARVALHO, J. D. G.; ANDRADE, A. A. Avaliação microbiológica de queijo de coalho artesanais e industrializados comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n. 345, p. 217-220, jul./ago, 2005.

BUSANI, L.; CIGLIANO, A.; TAIOLI, E.; CALIGIURI, V.; CHIAVACCI, L.; DI BELLA, C.; BATTISTI, A.; DURANTI, A.; GIANFRANCESCHI, M.; NARDELLA, M. C.; ROLESU, S.; TAMBA, M.; MARABELLI, R.; CAPRIOLI, A. Prevalence of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* contamination in food of animal origin in Italy. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 8, p. 1729-1733, Aug., 2005.

CAETANO, V. C.; SALTINI, D. A. S.; PASTERNAK, J. Surto de salmonelose por *Salmonella enterica* em profissionais de saúde, causado por alimentos consumidos em uma festa de ano novo realizada dentro da Unidade de Terapia Intensiva. **Einstein**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 33-35, jan., 2004. Disponível em: <<http://www.einstein.br/biblioteca/artigos/Vol2Num1/Case%20Report%20=%20Surto%20de%20salmonelose.pdf>>. Acesso em: 13 abr. 2006.

CARELI, R. T.; DIAS, A. S.; ANDRADE, N. J.; ANTUNES, M. A. Qualidade de água e condições higiênicas de manipuladores, equipamentos e utensílios em micro-indústrias de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, MG, v. 58, n. 333, p. 85-88, jul./ago., 2003a.

CARELI, R. T.; DIAS, A. S.; ANDRADE, N. J.; ANTUNES, M. A. Proposição, implantação e avaliação de procedimentos de higienização para micro-indústrias

de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, MG, v. 58, n. 333, p. 89-91, jul./ago., 2003b.

CARMO, G. M. I.; OLIVEIRA, A. A.; DIMECH, C. P.; SANTOS, D. A.; ALMEIDA, M. G.; BERTO, L. H.; ALVES, R. M. S.; CARMO, E. H. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico** - Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, DF, ano 5, n. 6, p. 1-7, dez., 2005. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf> Acesso em: 19 jul. 2006.

CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo Minas Frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas**. 2003. 107p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CASSAROTTI, V. T.; GALLO, C. R.; CAMARGO, R. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas Frescal comercializados em Piracicaba – SP. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.44, n. 3, p. 158-163, Sept., 1994.

CATÃO, R. M.R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 281-287, set/dez., 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Salmonella surveillance: Annual Summary, 2004**. Atlanta: United States Department of Health and Human Services/CDC, 2005. 15p. Disponível em:
<<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2004/Salmonellainroduction2004.pdf>>. Acesso em: 08 Mar. 2006.

COLAK, H.; HAMPIKYAN, H.; BINGOL, E. B.; ULUSOY, B. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. **Food Control**, Oxford, *In Press*.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 342-346, out./dez., 2002.

COTTON, L. N.; WHITE, C. H. *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella* in dairy plant environments. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 75, n. 1, p. 51-57, Jan., 1992.

DALTON, C. B.; GREGORY, J.; KIRK, M. D.; STAFFORD, R. J.; GIVNEY, R.; KRAA, E.; GOULD, D. Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000. **Communicable Diseases Intelligence**, Canberra, v. 28, n. 2, p. 211-224, Feb., 2004.

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

DESENCLOS, J. C.; BOUVET, F.; BENZ-LEMOINE, E.; GRIMONT, F.; DESQUEYROUX, H.; REBIERE, I.; GRIMONT, P. A. Large outbreak of *Salmonella enterica* serotype paratyphi B infection caused by a goats' milk cheese, France, 1993: a case finding and epidemiological study. **British Medical Journal**, London, v. 312, n. 1, p. 91-94, Jan., 1996.

DI PIETRO, S.; HARITCHABALET, K.; CANTONI, G.; IGLESIAS, L.; MANCINI, S.; TEMPERONI, A.; LABANCHI, J. L.; BARBAROSSA, N.; GARCIA, M. T.; ROSALES, S.; HERRERO, E.; BIGATTI, R.; ORELLANA, O.; LARIEU, E.

Surveillance of foodborne diseases in the province of Rio Negro, Argentina, 1993-2001. **Medicina**, Buenos Aires, v. 64, n. 2, p. 120-124, Mar./Apr., 2004.

DUARTE, D. A. M.; SCHUCH, D. M. T.; SANTOS, S. B.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SILVA, J. V. D.; MOTA, R. A. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado do Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 297-302, jul./set, 2005.

EL-GAZZAR; F.; MARTH, E. H. *Salmonellae*, salmonellosis, and dairy foods: a review. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 75, n. 9, p. 2327-2343, Sept. 1992.

ESPER, L. M. R. **Diagnóstico da qualidade de ricotas comercializadas no município de Campinas – SP**. 2006. 114p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 162-165, set./dez., 2003.

FENG, P.; WEAGANT, S. D. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: UNITED STATES FOOD DRUG ADMINISTRATION (Ed.). **Bacteriological analytical manual online**. 8th ed. Rockville: FDA, 2002. Chap. 4. p. 4.1-14. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>> Acesso em: 12 Jan. 06.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) / WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Statistical information on food-borne disease in Europe microbiological and chemical hazards. In: PAN-EUROPEAN CONFERENCE ON FOOD SAFETY AND QUALITY, 1, 2002, Budapest. [**Proceeding**]. Roma: FAO/WHO, 2002. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/004/y369e/y369e00.pdf>. Acesso em: 07 Feb. 2006.

FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOEFLEIN, C.; LUETHY, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of hemolysin gene fragments. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 70, n. 5, p. 372-379, May, 1991.

GARRIDO, N. S.; MORAIS, J. M. T.; BRIGANTI, R. C.; OLIVEIRA, M. A.; BERGAMINI, A. M. M.; OLIVEIRA, S. A. V.; FÁVORO, R. M. D. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto – SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 141-146, jul./dez., 2001.

HEADRICK, M. L.; KORANGY, S.; BEAN, N. H.; ANGULO, F. J.; ALTEKRUSE, S. F.; POTTER, M. E.; KLONTZ, K. C. The epidemiology of raw milk-associated Foodborne disease outbreaks reported in the United States, 1973 through 1992. **American Journal of Public Health**, Washington, v. 88, n. 8, p. 1219-1221, Aug., 1998.

KABUKI, D. Y. Rastreio de *Listeria monocytogenes* em indústrias processadoras de queijo fresco tipo Latino, nos Estados Unidos da América, empregando a subtipagem molecular. 2005. 135p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresch-cheese processing plants. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, n. 9, p. 2803-2812, Sept. 2004.

KANG, Y. J.; FRANK, F. J. Characteristics of biological aerosols in dairy processing plants. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 73, n. 3, p. 621-626, Mar., 1989.

KIM, H.; FENG, P. Bottled water. . In: DOWNES, F.P.; ITO, H. (Ed) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. Chap. 60, p. 537-576.

KOZAK, J.; BALMER, T.; BYRNE, R.; FISHER, K. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: incidence in dairy products. **Food Control**, Oxford, v. 7, n. 4/5, Apr./Mar., 1996

LEITE, C. C.; GUIMARÃES, A. G.; ASSIS, P. N.; ANDRADE, C. S. O. Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) comercializado em Salvador – Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 3, n. 1, p. 21-25, jan./mar., 2002.

LEITE JÚNIOR, A. F. S.; FLORENTINO, E. R.; OLIVEIRA, E. B. D.; TORRANO, A. D. M. Qualidade microbiológica do “queijo de coalho” comercializado a temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande - PB. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 73, p. 53-59, jun., 2000.

MACHADO, G. C.; CHAVES, J. B. P. Estratégias para implantação de um sistema de qualidade em indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 311, n. 54, p. 1-50, jan./mar., 1999.

- MENDES, E. S.; LIMA, E. C.; NUMERIANO, A. K. M.; COELHO, M. I. S. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e coliformes em queijos de "coalho" comercializadas em Recife. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 66/67, p. 122-126, nov./dez., 1999.
- MODI, R.; HIRVI, Y.; HILL, A.; GRIFFITHS, M.W. Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 7, p. 927-933, July, 2001.
- NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D. M. S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 32, n. 1, p. 47-51, jan., 2004.
- NASSU, R. T.; LIMA, J. R.; BASTOS, M. S. R.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no Estado do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 89, p. 28-36, jul., 2001.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, J. N.; SILVA, V. P.; FRANCO, B. G. M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 211-215, jul./set, 2004.
- OLIVIERI, D. A. **Avaliação da qualidade microbiologia de amostras de mercado de queijo mussarela, elaborado a partir de leite de búfala (*Bubalus bubalis*)**. 2004. 61p. Dissertação (Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

OLSEN, S. J.; MACKINON, L. C.; GOULGING, J. S.; SLUTSKER, L. Surveillance for foodborne diseases outbreaks, 1992-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, n. SS01, p. 1-51, Mar., 2000.

PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: CANADA. Health Products and Food Branch. **Compendium of analytical methods: laboratory procedures of microbiological analytical of foods**, [MFHPB 30]. Ottawa, 2001. Disponível em: <www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>. Acesso em: 22 Out. 2005.

PAIVA. M. S. D.; CARDONHA, A. M. S. Queijo de coalho artesanal e industrializado produzidos no Rio Grande do Norte. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n. 61, p. 33-37, jan./fev., 1999.

PEREIRA, M. L.; CASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W. T., FALEIRO, E. S. C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 5, p. 427-431, out., 1999.

PEREZ, R. M. **Perfil sensorial, físico-químico e funcional de queijo de coalho comercializado no município de Campinas - SP**. 2005. 122p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campina, 2005.

RAPINI, L. C.; FEIJÓ, L. D.; VERAS, J. F.; NASCIMENTO, K. F.; AMADO, J. B.; COUTO, I. P.; CARMO, L. S.; SILVA, M. C. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Listeria* sp. e *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo de coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 60-65, jul./ago, 2002.

REN, T. J.; FRANK, F.J. Measurement of airborne contamination in two commercial ice cream plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 1, p. 927-933, Jan., 1992.

ROCHA, J. A. K. **Estudo da presença de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* em indústria processadora de queijo Minas frescal**. 2004. 85p.
Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

RYSER, E. T. Incidence and behaviour of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. In: RYSER, E.; MARTH, E. H. (Ed.). **Listeria, listeriosis and food safety**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1999b. Chap. 12, p. 411-358.

SALUSTIANO, V. C.; ANDRADE, N.J.; BRANDÃO, S. C. C.; AZEREDO, R. M. C.; LIMA, S. A. K. Microbiological air quality of processing areas in a dairy plant as evaluated by the sedimentation technique and a one-stage air sampler. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 2, 255-259, Apr./June, 2003.

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA (SDA). Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de manteiga de terra, queijo de coalho e queijo de manteiga. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 16 jul. 2001a. Disponível em:
<<http://200.252.165.21/sda/dipoa/instnorm30aiirtqueijomanteiga.htm>>.
Acesso em: 28 jan. 2006.

SILVA, C. C.; RODRIGUES, M. M.; MARTINS, B. R.; EDUARDO, M. B. P.; BASSIT, N. P.; CÉSAR, M. L. V. S.; KATO, M. A. M.; FERNANDES, S. A.; THIAGO, C.; PIMENTEL, E. P.; PAVANELLI, E. I.; COLLEONE, R. P.; VIGILATO, M. A. N.; RANDI, A.P. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* em, São Paulo/ SP, Setembro de 2004. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 1, n.11, p. 1-8, set, 2004. Disponível em:

<http://www.cve.saude.sp.gov.br/bepa11_salmo.htm>. Acesso em: 07 abr. 2006.

SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 3, p. 354-356, Mar., 1998.

SOOMRO, A. H.; ARAIN, M. A.; KHASKHELL, M.; BHUTTO, B. Isolation of *Escherichia coli* from raw milk and products in relation to public health sold under market conditions at Tandojam. **Pakistan Journal of Nutrition**, Tandojam, v. 1, n. 3, p. 151-152, May/June, 2002.

SOUSA, S. **Ocorrência de *Listeria* spp. em queijo de massa crua tipo coalho, comercializado no município de João Pessoa – PB**. 1999. 120p. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1999.

WIEDMANN, M.; BRUCE, J. L.; KEATING, C.; JOHNSON, A. E.; MCDONOUGH, P. L.; BATT, C. A. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, n. 7, p. 2707-2716, July, 1997.

CAPÍTULO III

PERFIL DE CONTAMINAÇÃO POR *Staphylococcus* sp. E *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA E DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS EM UMA LINHA DE PRODUÇÃO DE QUEIJO DE COALHO

Perfil de Contaminação por *Staphylococcus* sp. e *Staphylococcus* Coagulase Positiva e Detecção de Enterotoxinas em uma Linha de Produção de Queijo de Coalho

RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar o perfil de contaminação por *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus* coagulase positiva e a ocorrência de enterotoxina estafilocócica em amostras de uma linha de produção de queijo. Foram analisadas 195 amostras, coletadas de cinco processamentos, incluindo leite cru, leite pasteurizado, coalhada, queijo, superfícies de equipamentos, móveis, utensílios e luvas de manipuladores. A contagem e identificação de *Staphylococcus* foram realizadas conforme recomendações do *Bacteriological Analytical Manual* (FDA). A ocorrência de enterotoxinas foi avaliada através do método imunoenzimático ELFA (*Staph enterotoxin II*® - BioMérieux). A população de *Staphylococcus* sp. variou de zero, no leite pasteurizado, a $1,5 \times 10^7$ UFC/mL, no leite cru, enquanto a de *Staphylococcus* coagulase positiva oscilou entre zero, no leite pasteurizado, e $5,0 \times 10^6$ UFC/mL, no leite cru. *Staphylococcus* coagulase positiva foi detectado em 100% das amostras de leite cru (25) e em 8% das amostras de queijos (2/25). As contagens de *Staphylococcus* sp. em equipamentos, móveis e utensílios oscilaram entre $<10^2$ a $3,2 \times 10^4$ UFC/cm². Identificou-se 12 espécies de *Staphylococcus*, entre os 102 isolados selecionados, sendo nove coagulase negativa e três coagulase positiva. No leite cru observou-se alta frequência de espécies coagulase positiva, com prevalência de *S. aureus*, enquanto nas demais amostras de produtos, luvas dos manipuladores, superfícies de equipamentos, móveis e utensílios houve alta frequência de espécies coagulase negativa e baixa frequência de espécies coagulase positiva. A presença de enterotoxina estafilocócica foi constatada em 20% das amostras de leite cru e, conseqüentemente, também detectada no leite pasteurizado, na coalhada e no queijo obtido a partir desse leite. A detecção de *Staphylococcus* com potencial enterotoxigênico e a presença de enterotoxinas indicam contaminação na linha de produção do queijo de coalho, possivelmente devido a não adoção ou falhas das Boas Práticas de Fabricação desde a obtenção do leite até o produto final (queijo).

Palavras-chave: *Staphylococcus*, intoxicação estafilocócica, produtos lácteos.

1. INTRODUÇÃO

O queijo de coalho é muito consumido na região Nordeste e, sua produção, representa importante atividade econômica e social. Vários estudos têm classificado o queijo de coalho, principalmente o artesanal, como impróprio para o consumo humano devido ao elevado nível de contaminação por bactérias patogênicas (BORGES *et al.*, 2003; FEITOSA *et al.*, 2003). Dentre estas, destacam-se espécies de *Staphylococcus* enterotoxigênicos, principalmente *S. aureus*.

A contaminação do leite e do queijo de coalho por *Staphylococcus* enterotoxigênicos, incluindo espécies produtoras de coagulase e não produtoras de coagulase, representa um problema de saúde pública, pelo risco de provocar intoxicação alimentar aos consumidores. Algumas cepas dessas bactérias, quando presentes em populações elevadas (10^5 - 10^6 UFC/mL ou g) e sob condições adequadas (temperatura, pH, atividade de água e O₂) produzem uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas (SE) nos alimentos, as quais depois de ingeridas causam intoxicação estafilocócica (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; JABLONSKI; BOHACH, 2001; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

Entre as espécies coagulase positiva, *S. aureus* é a mais associada a casos e surtos de intoxicação alimentar, devido à habilidade de muitas de suas cepas produzirem vários tipos de enterotoxinas (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; OMOE *et al.*, 2005). Outras espécies produtoras de coagulase, como *S. intermedius* (BECKER *et al.*, 2001) e *S. hyicus* (ADESIYUN; TATINI; HOOVER, 1984), também produzem enterotoxinas e têm sido envolvidas em alguns surtos (KHAMBATY; BENNET; SHAH, 1994; BENNET, 1996). *S. intermedius* podem ser potenciais causadores de intoxicação alimentar (KHAMBATY; BENNET; SHAH, 1994).

A produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* não produtores de coagulase, tais como, *S. capitis*, *S. cohnii* subsp *cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. warneri*, *S. xylosus* e *S. chromogenes* tem sido relatada em vários estudos, sendo a maioria sob condições de laboratório (VERNOZY-ROZAND *et al.*, 1996a; OLIVEIRA, 1999; PEREIRA; CARMO; PEREIRA, 2001). Os resultados de alguns destes estudos sugerem que *Staphylococcus* não produtores de coagulase (RODRIGUEZ *et al.*, 1996; VERNOZY-ROZAND *et al.*, 1996b; UDO *et al.*, 1999) podem ser potenciais causadores de intoxicação alimentar. Já foram relatados três surtos de intoxicação estafilocócica associados a espécies coagulase negativa (PEREIRA; PEREIRA, 2005). O primeiro deles ocorreu em Osaka, Japão, e foi atribuído ao consumo de leite (OMORI; KATO, 1959). O segundo foi relatado nos Estados Unidos, e o alimento envolvido no surto foi carne assada (BRECKINRIDGE; BERGDOLL, 1971). O terceiro surto ocorreu no Brasil, associado ao consumo de leite cru (CARMO *et al.*, 2002; VERAS *et al.*, 2003).

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas extracelulares (de baixo peso molecular), hidrossolúveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo permanecendo ativas após a ingestão. Outra característica importante é sua termoestabilidade, sendo capazes de resistir a tratamentos térmicos como a pasteurização e a ultrapasteurização. Recentemente, a lista da família de enterotoxinas foi expandida pela detecção de novos genes e, até o momento, já foram identificados 18 tipos de enterotoxinas distintas, mas com similaridade na estrutura e seqüência. As clássicas SEA, SEB, SEC_{1, 2, 3}, SED e SEE, são as de maior ocorrência (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; MARTIN; MYERS; LANDOLO, 2001). Outras treze enterotoxinas (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER E SEU) foram identificadas e seus genes (*seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq, ser e seu*) correspondentes descritos (JARRAUD *et al.*, 2001; OMOE *et al.*, 2002;

LETERTRE *et al.*, 2003; OMOE *et al.*, 2003; BLAIOTTA *et al.*, 2004; OMOE *et al.*, 2005).

A intoxicação estafilocócica é a causa mais freqüente de surtos de doenças microbianas de origem alimentar, em muitos países. A doença manifesta-se logo após a ingestão do alimento com enterotoxinas pré-formadas e o início dos sintomas é repentino e severo, com náusea, vômitos e cólicas, prostração, hipotensão e hipotermia (MARTIN; MYERS; LANDOLO, 2001; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). O período de incubação oscila de 30 minutos a 8 horas, porém, na maioria dos casos, os sintomas aparecem entre 2 e 4 horas após a ingestão do alimento contaminado (BANNERMAN, 2003). A recuperação ocorre em torno de dois dias, porém, alguns casos podem levar mais tempo ou exigir hospitalização (JABLONSKI; BOHACH, 2001). Caso de óbito é raro, mas pode ocorrer em idosos, crianças e indivíduos debilitados. Embora a dose necessária para causar a doença ainda não esteja bem estabelecida, sabe-se que a ingestão de menos de 1ng de enterotoxina por grama de alimento contaminado é suficiente para causar sintomas associados a uma intoxicação (JABLONSKI; BOHACH, 2001; MARTIN; MYERS; LANDOLO, 2001).

Surtos e casos esporádicos de intoxicação estafilocócica atribuídos ao consumo de produtos lácteos, principalmente queijos, têm sido relatados em vários países (CARMO *et al.*, 1995; ALTEKRUSE, *et al.*, 1998; MEYRAND; VERNOSY-ROZAND, 1999; DE BUYSER *et al.*, 2001; NIID, 2001; LECLERC *et al.*, 2002; CARMO *et al.*, 2002; ASAO *et al.*, 2003).

Nos Estados Unidos, estima-se que *S. aureus* causa, aproximadamente, 185.000 casos, com 1.750 hospitalizações e duas mortes, por ano (MEAD *et al.*, 1999), com um custo anual estimado em US\$ 1,5 bilhões de dólares (SU; WONG, 1997; HARVEY; GILMOUR, 2000). No período de 1993-1997, este patógeno foi envolvido em 42 surtos de intoxicação alimentar, com 1.413 casos notificados e um óbito (OLSEN *et al.*, 2000). Leite e queijos estavam entre os alimentos

envolvidos. Atualmente, a intoxicação estafilocócica representa 4,5% das doenças de origem alimentar bacteriana, sendo responsável por 1.753 hospitalizações e duas mortes a cada ano (USDA, 2006).

Na Europa, no período de 1993-1998, surtos de intoxicações estafilocócicas foram monitorados em vários países. Os produtos lácteos foram responsáveis por 3,9% dos surtos na Alemanha; 5,4% na Bélgica; 9,1% na Escócia; 1,6% na Espanha; 26% na França; 3,0% na Inglaterra e Países de Gales; 3,6% na Itália; 5,0% na Holanda; 1,7% em Portugal e 1,7% na Suécia (FAO/WHO, 2002). Na Noruega, no período de 1993-1998, 24,2% dos surtos de doenças de origem alimentar foram causados por *S. aureus* e 6,7% dos alimentos incriminados eram produtos lácteos (FAO/WHO, 2002).

Na América Latina e Caribe, no período de 1993 a 2002, ocorreram 250 surtos de intoxicação estafilocócica envolvendo produtos lácteos, com acometimento de 4.247 pessoas, em 11 países desta região. Há 16 relatos de surtos causados por queijos ocorridos no Brasil, com 85 pessoas acometidas. Destes surtos, dois foram notificados no estado do Ceará no ano de 2000, atribuídos ao consumo de queijos e envolveu 14 pessoas (INPPAZ/OPS/OMS, 2006).

No Brasil, o número de surtos e casos esporádicos de intoxicações estafilocócicas são superiores aos reportados pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Muitos casos não são notificados ou investigados, devido, principalmente, ao rápido curso da doença. No período de 1999 a 2004 foram notificados 3.064 surtos de DTA a SVS, com acometimento de 57.353 pessoas e registro de 37 óbitos. *S. aureus* foi identificado em 18,1% dos casos, ocupando a segunda posição entre os agentes etiológicos identificados (CARMO *et al.*, 2005).

Os surtos de DTA investigados envolvendo produtos lácteos têm sido associados principalmente ao consumo de queijos do tipo Minas frescal (SABIONI;

NASCIMENTO; PEREIRA, 1988), queijo Minas (SABIONI; NASCIMENTO; PEREIRA, 1994; PEREIRA *et al.*, 1996; CARMO *et al.*, 2002) e de queijo de coalho (INPPAZ/OPS/OMS, 2006).

No período de 1997 a 2002, vários surtos de intoxicação alimentar, ocorridos no estado de Minas Gerais, foram investigados pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Leite e produtos derivados (queijo canastra, queijo curado, queijo minas, queijo mussarela, queijo ralado, requeijão e bebida Láctea) foram envolvidos em muitos casos. 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, conforme relatórios da FUNED no período de 1995 a 2001, alimentos contaminados com enterotoxinas estafilocócicas produzidas por *S. aureus*, causaram 112 surtos, com o envolvimento de 12.820 pessoas e 17 mortes. Diversos tipos de queijos foram responsáveis por 23 destes surtos, com 600 pessoas acometidas e um óbito (CARMO, 2002).

No Ceará, o Núcleo de Epidemiologia da Secretária de Saúde do Estado do Ceará, através do Informe Anual de Surtos de DTA em 2003, notificou cinco surtos de DTA, envolvendo 311 pessoas. Um surto foi atribuído ao consumo de queijo Minas frescal e queijo de coalho. Onze pessoas foram acometidas por intoxicação estafilocócica (CEARÁ, 2004).

A presença de *Staphylococcus* enterotoxigênicos e suas enterotoxinas tem sido constatada com frequência em produtos lácteos, principalmente em leite cru e queijos produzidos em muitos países. Normanno e outros (2005), no período de 2000 a 2002, investigaram a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva e *S. aureus* em 3.097 amostras de produtos lácteos italianos (leite cru e leite pasteurizado, queijos, coalhada, ricota, sorvetes e outro derivados) e constataram a presença de *S. aureus* em 21% (641) dos produtos analisados. De Luca, Zanetti

e Stampi (1997) avaliaram a contaminação de produtos lácteos, comercializados em Bologna, por *S. aureus* e *Staphylococcus* sp. *S. aureus* foi detectado em 16,3% das 135 amostras de queijos analisados, assim distribuídos: 8,3% em queijo macio; 17,6 em queijo azul; 18,9% em queijo semimacio e 25% em queijo mussarela. Rosec e outros (1997) isolaram 213 cepas de *S. aureus* de 121 gêneros alimentícios na França, incluindo leite e queijos, e constataram que 30,5% (65) das cepas eram capazes de produzir ao menos uma ou duas das cinco enterotoxinas clássicas, A, B, C, D e E. Holecková e outros (2002) avaliaram a ocorrência de *S. aureus* enterotoxigênicos em vários alimentos na Eslováquia, e verificaram alta porcentagem de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicos em queijo de leite de ovelha. Loncarevic e outros (2005) observaram grande diversidade de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicos isoladas de leite cru e produtos lácteos obtidos de leite cru produzidos na Noruega.

No Brasil, a presença de *S. aureus* tem sido constatada com maior frequência em queijo Minas frescal (CARMO *et al.*, 1995; SABIONI; HIROOKA; SOUZA, 1988; ARAÚJO *et al.*, 2002; CARVALHO, 2003; LEITE; LIMA; REIS, 2005) e em queijo de coalho (FLORENTINO; MARTINS, 1999; LEITE JÚNIOR *et al.*, 2000; BORGES *et al.*, 2003; FEITOSA *et al.*, 2003).

A incidência de *Staphylococcus* coagulase positiva e *S. aureus* em queijo de coalho é alta e tem sido relatada em vários estudos (FLORENTINO; MARTINS, 1999; MENDES *et al.*, 1999; PAIVA; CARDONHA, 1999; BORGES *et al.*, 2003; LIMA, 2005). Na maioria destes estudos, os queijos são classificados como impróprios para o consumo humano, dada à constatação de níveis de contaminação superiores aos permitidos pela legislação (ANVISA, 2001).

No Ceará, Borges e outros (2003) avaliaram 43 amostras de queijo de coalho, produzido em 11 municípios, pertencentes a cinco microrregiões produtoras de leite, e verificaram que 91% (39) das amostras estavam contaminadas por *Staphylococcus* coagulase positiva em níveis superiores ao

estabelecido pela legislação (10^3 UFC/g). Em outro estudo, Bruno e outros (2005) observaram que 50% (4/8) das amostras de queijo de coalho artesanais e industriais analisadas estavam em desacordo com os padrões microbiológicos em função da elevada contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva ($3,2 \times 10^7$ a $3,0 \times 10^8$ UFC/g).

No Rio Grande do Norte, Feitosa e outros (2003) observaram que 72,7% (8/11) das amostras de queijo de coalho produzido em diferentes microrregiões do Estado, apresentavam contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva em níveis superiores ao estabelecido pela legislação.

O leite cru, obtido de animais com infecção estafilocócica nas glândulas mamárias (mastite), é a principal fonte de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicos. A produção de vários tipos de enterotoxinas estafilocócicas por cepas de *S. aureus*, isoladas de leite proveniente de vacas com mastite, têm sido constatada em pesquisas realizadas em países; tais como: Estados Unidos (CENCI-GOGA *et al.*, 2003); Alemanha (AKINEDEN *et al.*, 2001); Noruega (LONCAREVIC *et al.*, 2005); Brasil (LAMAITA *et al.*, 2005), entre outros.

No Brasil, têm sido realizados alguns estudos para avaliar o potencial enterotoxigênico e de produção de enterotoxinas por cepas de *Staphylococcus* isoladas de alimentos, principalmente queijo Minas frescal (CARMO *et al.*, 1995; SABIONI; HIROOKA; SOUZA, 1988; ARAÚJO *et al.*, 2002), queijo mussarela (NICOLAU *et al.*, 2001) e queijo de coalho (BORGES *et al.*, 2003; FEITOSA *et al.*, 2003; LIMA, 2005).

Nicolau e outros (2001) avaliaram o potencial de produção e tipos de enterotoxinas estafilocócicas produzidas por cepas de *S. aureus*, em extratos de amostras de queijo mussarela, fabricado na região de Goiânia – GO. A presença do patógeno foi observada em 58,2% (127/218) das amostras e 9,8% (13/132) das cepas *S. aureus* analisadas apresentaram potencial para produção de

enterotoxinas. Das 13 cepas enterotoxigênicas 61,5% (8) produziram SEA, 23,1% (3) SEB, 7,7% (1) SEC, e 7,7% (1) SEA e SEB. Nos extratos de queijo, a presença de enterotoxinas foi detectada em 9,2% (7/76) das amostras, sendo que destas, 71,5% (5) eram SEA e 28,5% (2) SEB.

Sena (2000) analisou 90 amostras de queijo de coalho comercializado em Recife – PE e isolou 377 cepas de *Staphylococcus*, assim distribuídas: 218 (57,8%) de *S. aureus*; 96 (25,5%) de *S. epidermidis*; 41 (10,9%) de *S. hyicus* e 22 (5,8%) de *S. intermedius*. Os *pools* de cepas foram testados quanto ao potencial de produção de enterotoxinas por indução sob condições laboratoriais e observou-se que dos 78 *pools* de *S. aureus*, 48 (61,5%) produziram SEB; 10 (12,5%) SEC e 2 (2,5%) SED. Dos 11 *pools* de *S. intermedius*, 7 (63,6%) produziram SEB e os *pools* de *S. epidermidis* e de *S. hyicus* não produziram enterotoxinas.

Cunha Neto, Silva e Stanford (2002), isolaram *Staphylococcus* enterotoxigênicos em vários alimentos, incluindo queijo de coalho e leite em pó integral, comercializados em Recife – PE. As contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva variaram de $<10^2$ a $1,5 \times 10^4$ UFC/g para estes dois produtos e 100% das cepas isoladas de queijo de coalho foram positivas para enterotoxinas estafilocócicas clássicas. Em outro estudo, Rapini e outros (2002) observaram que 100% das amostras de queijo de coalho comercializadas nas praias de Salvador e Maceió, estavam contaminadas por *Staphylococcus* sp. e apresentavam enterotoxinas SEB e SEC.

A técnica imunoenzimática ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) permite a detecção simultânea de enterotoxinas estafilocócicas A, B, C₁, 2, 3, D e E em fluidos sobrenadantes de culturas de *Staphylococcus* spp., e extratos de alimentos. Esta técnica tem sido empregada na pesquisa de enterotoxinas em queijos (LIMA, 2005) e na avaliação do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus* spp. isolados de alimentos (CUNHA NETO; SILVA; STANFORD, 2002).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a contaminação por *Staphylococcus* sp. e *Staphylococcus* coagulase positiva em uma linha de produção de queijo de coalho e detectar a presença de enterotoxinas estafilocócicas na matéria prima e no produto final.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras

As amostras foram coletadas em uma indústria de laticínios na região metropolitana de Fortaleza – CE, a intervalos de 45-50 dias, no período de maio a outubro de 2004. Um total de 195 amostras foi coletado de cinco lotes de produção (I, II, III, IV e V), em 23 pontos da linha de produção de queijo de coalho (**Figura 5**). Os pontos de coleta de amostras com a mesma denominação, a exemplo da prateleira (I, II e III), foram numerados com algarismos romanos de acordo com a localização na planta de processamento. As luvas utilizadas pelos manipuladores receberam numeração de 1 a 3.

O leite cru foi coletado no tanque de recepção e, o leite pasteurizado, na saída do pasteurizador. A coalhada foi coletada após a segunda dessoragem e os queijos após a maturação e embalagem. As amostras das superfícies dos equipamentos, móveis e utensílios foram coletadas após higienização da linha de produção, com auxílio de moldes (10 X 10cm) utilizando o método de contato de esponja, que consiste na pressão e arraste de esponja estéril (*Nasco*) de celulose embebida em 10 ml de solução peptonada adicionada de neutralizante para compostos clorados (tiosulfato de sódio) contra o local a ser analisado, conforme recomendações da *American Public Health Association* - APHA (EVANCHO; SVEUM; FRANK, 2001). As luvas de latex utilizadas pelos manipuladores

Fluxograma	Pontos de coleta (Nº total de amostras)
Recepção do leite ↓	1 - Leite cru (25); 2 - Parede do tanque (05);
Pesagem / Filtração ↓	
Aquecimento (35°C) ↓	
Pasteurização ↓	3 - Leite pasteurizado (25); 4 - Tubulação de saída do pasteurizador (05);
Adição de fermento / CaCl ₂ ↓	
Adição de coalho ↓	5 - Homogeneizador (05);
Coagulação ↓	6 - Tanque de coagulação (05);
Corte da coalhada / Repouso ↓	7 - Lira de corte vertical (05); 8 - Lira de corte horizontal (05);
Mexedura ↓	9 - Garfo / 05;
Primeira dessoragem ↓	10 - Mangueira (05); 11 - Cilindro (05);
Mexedura da massa ↓	
Segunda dessoragem ↓	12 - Coalhada (25);
Salga ↓	
Enformagem ↓	13- Mesa de enformagem (05); 14 - Forma (05); 15 - Dessorador (05); 16 - Luva 1 (05);
Pré-prensagem / Viragem ↓	17 - Luva 2 (05);
Prensagem ↓	
Maturação ↓	18 - Prateleira I (05)
Embalagem ↓	19 - Embalagem (05); 20- Luva 3 (05); 21 - Prateleira II (05);
Queijo de Coalho ↓	22 - Queijo (25);
Estocagem	23 - Prateleira III (05)

Figura 5 . Fluxograma de processamento do queijo de coalho, pontos de coleta e número de amostras coletadas para análise de *Staphylococcus* sp.

também foram amostradas através do método de contato de esponja (EVANCHO; SVEUM; FRANK, 2001). Após cada coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo, e transportadas para o Laboratório de

Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza – CE, para análise microbiológica.

2.2. Contagem e identificação de *Staphylococcus* spp.

A contagem de *Staphylococcus* sp. foi realizada em 195 amostras, sendo 25 de cada produto: leite cru, leite pasteurizado, coalhada e queijo; e, 95 amostras de superfícies de equipamentos, móveis, utensílios e luvas utilizadas pelos manipuladores. As amostras foram analisadas conforme metodologia do *Bacteriological Analytical Manual / FDA* (BENNETT; LANCETTE, 2001). Alíquota de 25 g ou mL de cada amostra foi homogeneizada em *Stomacher* (Seward Ltd., London) e diluições adequadas foram inoculadas em ágar *Baird-Parker*. Após a incubação, placas contendo entre 20 e 200 colônias, para produtos (leite, coalhada e queijo), e entre 1 a 200 colônias, para equipamentos e superfícies, foram selecionadas para as contagens (UFC/mL ou g). Cinco a dez colônias características do gênero, sendo de uma a cinco típicas de *S. aureus*, foram submetidas a testes fisiológicos e bioquímicos (reação de Gram, produção de catalase, coagulase e DNase). A partir destes testes, foram selecionados 102 isolados representativos, dos 23 pontos da linha de produção avaliados, para identificação fenotípica em nível de espécie, através do sistema de identificação de estafilococos e micrococos *API-Staph* (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile - France).

2.3. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas

A pesquisa de enterotoxinas foi realizada em 20 amostras, sendo cada uma composta por cinco unidades amostrais dos produtos: leite cru, leite pasteurizado, coalhada e de queijo. Os extratos das amostras foram preparados de acordo com o protocolo de preparações de amostras de produtos lácteos do método *VIDAS® Staph enterotoxin II* (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France). As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCA/FEA da UNICAMP, utilizando o kit *VIDAS® Staph enterotoxin II (SET2)*, que é um teste

imunoenzimático que utiliza ELFA (Imunoensaio enzima ligada fluorescente). O ensaio foi executado em um equipamento mini VIDAS[®] que realiza automaticamente todas as etapas da reação até a leitura final. O Valor Relativo de Fluorescência (RFV) é calculado e convertido pelo computador em resultado final do teste. Resultado com leitura superior a 0,13 é considerado positivo para enterotoxinas estafilocócicas A, B, C_{1,2, 3}, D e E.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das contagens de *Staphylococcus* sp. e *Staphylococcus* coagulase positiva em uma linha de produção de queijo de coalho são apresentados na **Tabela 12**.

O leite cru apresentou elevada população de *Staphylococcus* sp. e de *Staphylococcus* coagulase positiva em 100% (25/25) das amostras avaliadas. As contagens oscilaram entre $3,3 \times 10^4$ a $1,5 \times 10^7$ UFC/mL, para *Staphylococcus* sp. e de $8,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL, para *Staphylococcus* coagulase positiva. Este nível de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva é considerado alto (superior a $1,0 \times 10^5$ UFC/ml) e pode favorecer a produção de enterotoxinas estafilocócica sob condições ambientais adequadas. Esta contaminação pode ser atribuída à prevalência, principalmente de *S. aureus* como agente etiológico da mastite bovina, a ubiquidade deste patógeno na natureza e à não adoção das Boas Práticas de Fabricação na obtenção higiênica do leite, desde a ordenha até sua recepção no laticínio.

Contagens elevadas de *Staphylococcus* sp. e *Staphylococcus* coagulase positiva têm sido relatadas com frequência em leite cru e, na maioria das vezes, são associadas às condições higiênico-sanitárias de sua obtenção, conservação e transporte. Em Minas Gerais, Lamaita e outros (2005) observaram alta frequência de *Staphylococcus* sp. ($1,0 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^7$ UFC/mL) em leite cru estocado em tanques refrigerados de 80 propriedades rurais. Gomes e Gallo (1995)

constataram contagens de $1,2 \times 10^3$ a $7,4 \times 10^5$ UFC/mL de *Staphylococcus* sp. em amostras de leite cru comercializado em Piracicaba – SP. Em outro estudo, Nicolau e outros (2001) detectaram níveis de contaminação por *S. aureus* entre $3,3 \times 10^3$ a $5,2 \times 10^4$ UFC/mL, em leite cru proveniente de tanques de recepção em três indústrias de laticínios, na região de Goiânia –GO.

Tabela 12. Resultados da contagem de *Staphylococcus* sp. e *Staphylococcus* coagulase positiva em uma linha de produção de queijo de coalho*.

Lote	Leite		Coalhada	Queijo	Luva de Manipulador		
	Cru	Past.			1	2	3
<i>Staphylococcus</i> sp. (UFC/mL ou g ou luva)							
I	8,2 x 10 ⁶	3,2 x 10 ¹	8,6 x 10 ²	1,7 x 10 ³	<10 ²	4,0 x 10 ²	<10 ²
II	3,5 x 10 ⁵	2,9 x 10 ¹	5,5 x 10 ²	9,8 x 10 ¹	2,0 x 10 ²	2,0 x 10 ²	<10 ²
III	1,5 x 10 ⁷	<1,0	2,2 x 10 ²	2,6 x 10 ³	3,0 x 10 ²	3,1 x 10 ²	<10 ²
IV	2,8 x 10 ⁵	1,6 x 10 ¹	1,0 x 10 ²	1,0 x 10 ³	3,0 x 10 ²	<10 ²	8,1 x 10 ²
V	3,3 x 10 ⁴	<1,0	<10 ¹	1,2 x 10 ³	<10 ²	4,2 x 10 ³	8,1 x 10 ²
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i> (UFC/mL ou g ou luva)							
I	3,4 x 10 ⁶	<1,0	<10 ¹	<10 ¹	<10 ²	<10 ²	<10 ²
II	9,1 x 10 ⁴	<1,0	<10 ¹	<10 ¹	<10 ²	<10 ²	<10 ²
III	5,0 x 10 ⁶	<1,0	<10 ¹	2,0 x 10 ²	<10 ²	3,1 x 10 ²	<10 ²
IV	1,3 x 10 ⁵	<1,0	<10 ¹	<10 ¹	<10 ²	<10 ²	<10 ²
V	8,0 x 10 ³	<1,0	<10 ¹	1,9 x 10 ²	<10 ²	2,1 x 10 ²	5,0 x 10 ²

* Valores médios

ND: não detectado

Past.: pasteurizado

A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva não foi detectada no leite pasteurizado e, na coalhada, foram observadas apenas baixas contagens de *Staphylococcus* sp ($2,2$ a $8,6 \times 10^2$ UFC/ml ou g). No queijo, a contagem de *Staphylococcus* sp. variou de $9,8 \times 10^1$ a $2,6 \times 10^3$ UFC/g. *Staphylococcus*

coagulase positiva, com identificação de *S. aureus*, foi detectado nos queijos dos processamentos (lotes) III ($2,0 \times 10^2$ UFC/g) e V ($1,9 \times 10^2$ UFC/g). Mas de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade Qualidade de Queijo de Coalho (SDA, 2001) e com a Resolução Nº 12 da ANVISA (ANVISA, 2001), as contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva estavam dentro dos limites estabelecidos (até 10^3 UFC/g). Porém, a presença deste grupo de bactérias nos queijos indica que houve recontaminação após a pasteurização e, portanto, falhas na adoção do programa de Boas Práticas de Fabricação. A indústria envolvida no estudo é registrada e fiscalizada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) e adota as Boas Práticas de Fabricação, mas foram observadas várias não conformidades.

Em geral, os estudos sobre a qualidade microbiológica de queijo de coalho, têm relatado índice de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva superiores aos limites estabelecidos pela legislação (ANVISA, 2001). No Ceará, tem sido observado índices de contaminação que variam de 44 a 100%, incluindo queijos artesanais e industriais (BENEVIDES; TELLES, 2001; BRUNO *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2005). Lima (2005) constatou que 98,7% (79/80) dos queijos avaliados estavam contaminados com *Staphylococcus* sp. ($6,0 \times 10^4$ a $8,9 \times 10^7$ UFC/g) e 53,7% (43/80) com *Staphylococcus* coagulase positiva ($4,4 \times 10^4$ a $5,9 \times 10^7$ UFC/g). Borges e outros (2003) detectaram níveis de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva, entre $3,0 \times 10^4$ a $2,0 \times 10^9$ UFC/g, em 91% (39/43) das amostras de queijos. Bruno e outros (2005), verificaram que 50% (4/8) das amostras de queijo analisadas apresentavam elevada contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva ($3,2 \times 10^7$ a $3,0 \times 10^8$ UFC/g).

No Rio Grande do Norte, Feitosa e outros (2003) também observaram incidência de *Staphylococcus* coagulase positiva, em nível acima do que preconiza a legislação, em 72,7% (8/11) dos queijos analisados. Em Pernambuco, índice de contaminação oscilou entre 90% (MENDES *et al.*, 1999) a 98,1% (SENA, 2000). Na Paraíba, Florentino e Martins (1999) relataram que 70% das amostras de queijo analisadas apresentavam contagens de *Staphylococcus* coagulase em

desacordo com a legislação. Rapini e outros (2002) constataram elevada população de *Staphylococcus* sp. ($4,7 \times 10^4$ a $2,0 \times 10^7$ UFC/g) em 100% dos queijos comercializados nas praias de Salvador e Maceió. Em Aracaju, Nascimento e outros (2005) detectaram *Staphylococcus* sp. em 94% das amostras de queijo assado (tratamento térmico de 55°C) comercializados em vários pontos da cidade.

Observou-se que a maioria dos queijos de coalho avaliados nos trabalhos acima mencionados era produzida artesanalmente, em propriedades rurais a partir de leite cru e sem os devidos cuidados de higiene, ou em pequenas indústrias que não adotam as Boas Práticas de Fabricação. Conseqüentemente, o queijo de coalho apresentava alto nível de contaminação por bactérias patogênicas e não apresentavam segurança microbiológica.

Nas 5 avaliações realizadas nas luvas utilizadas pelos três manipuladores foi detectado baixo nível de contaminação tanto por *Staphylococcus* sp. ($<10^2$ a $4,2 \times 10^3$ UFC/luva) como por *Staphylococcus* coagulase positiva (*S. aureus*) ($<10^2$ a $2,1 \times 10^2$ UFC/luva) nos cinco processamentos. A presença de *S. aureus* foi observada em 20% (3/15) das amostras, sendo duas nas luvas do manipulador II, no processamento III e V e, a outra, nas luvas do manipulador III, durante o processamento V. A contaminação das luvas indica possível contaminação cruzada ao longo do processo.

Brum, Gonçalves e Masson (2004) verificaram que a higienização das mãos dos manipuladores de uma indústria de laticínios propiciou uma redução na contaminação por *S. aureus* de 25% (4/16) para 6% (1/16), indicando que as normas de higienização das mãos não estavam implantadas devidamente na indústria. Assumpção e outros (2003) relataram que a contaminação do queijo prato por *Staphylococcus* sp., estava associada às elevadas contagens desta bactéria nas mãos e nos antebraços dos manipuladores da linha de produção. Brabes e outros (2003) observaram prevalência de *S. aureus* em 20% (10/51) dos

isolados de *Staphylococcus* sp. provenientes das mãos de manipuladores. Em trabalhos realizados em estabelecimentos de alimentação, Vanzo e Azevedo (2003) verificaram altas taxas (41,8%) de manipuladores de alimentos portadores de *S. aureus*, em 10 unidades de alimentação, em Ribeirão Preto-SP. Andrade, Silva e Brabes (2003) relataram que 100% das mãos dos manipuladores de 12 restaurantes, localizados nas regiões Zona da Mata e Zona Metalúrgica de Minas Gerais, apresentaram contagens de *S. aureus* superiores a 10^3 UFC/mão.

Os resultados da contagem de *Staphylococcus* sp. em superfícies de equipamentos, móveis e utensílios na linha de produção do queijo de coalho podem ser observados na **Tabela 13**.

Staphylococcus sp. foi detectado em 9 das 16 superfícies dos equipamentos, móveis e utensílios monitorados. As contagens oscilaram entre <1 a 320UFC/cm². Em superfícies alguns de móveis, como mesa de enformagem, prateleiras das salas de embalagem e estocagem verificou-se, em média, níveis de contaminação superiores a 10UFC/cm². No entanto, a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva não foi detectada nas superfícies avaliadas, indicando que a linha de produção do queijo de coalho não apresentou contaminação por este grupo de bactérias patogênicas. Contudo, a grande variação observada nas contagens de *Staphylococcus* sp. indicou a falta de padronização nas operações de limpeza e sanitização na linha de produção. Equipamentos, móveis e utensílios submetidos à higienização inadequada podem comprometer a segurança microbiológica do produto. A obtenção de produtos lácteos seguros requer integração de programas efetivos de limpeza e sanitização e de Boas Práticas de Fabricação.

Procedimentos de higienização inadequados de superfícies dos equipamentos e utensílios em indústrias de laticínios, também, têm sido relatados em outros estudos (MACHADO; CHAVES, 1999; BRABES *et al.*, 2003; CARELI *et al.*, 2003). Brabes e outros (2003) verificaram que 27,5% (11/40) dos isolados de

Staphylococcus sp. provenientes de superfícies de equipamentos e utensílios utilizados na fabricação dos produtos lácteos eram *S. aureus*.

Tabela 13. Contagem de *Staphylococcus* sp. em superfícies de equipamentos, móveis e utensílios em uma linha de produção do queijo de coalho.

Superfície	<i>Staphylococcus</i> sp (UFC/cm ²)				
	Lote				
	I	II	III	IV	V
Tanque recepção	3,0	23	320	25	11
Tubulação pasteurizador	<1,0	66	<1,0	2,0	<1,0
Homogeneizador	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Tanque coagulação	<1,0	54	<1,0	12	<1,0
Lira vertical*	2,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Lira horizontal*	8,2	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Garfo*	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Mangueira drenar soro	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Cilindro retenção	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Mesa para enformagem	<1,0	190	8,0	5,0	41
Forma	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Dessorador de tecido	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Prateleira sala de maturação	<1,0	40	1,0	<1,0	<1,0
Embalagem	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Prateleira sala de embalagem	<1,0	40	19	24	<1,0
Prateleira sala de estocagem	260	11	<1,0	120	<1,0

* UFC/Unidade amostral

Perfil de espécies de *Staphylococcus* isoladas dos produtos, equipamentos, utensílios e luvas utilizadas pelos manipuladores, identificadas através API® *Staph* (BioMérieux) é apresentado na **Tabela 14**.

Tabela 14. Perfil de espécies de *Staphylococcus* isoladas na linha de produção de queijo de coalho (API® Staph – BioMérieux).

Amostra	Lote / Espécie (nº isolados)				
	I	II	III	IV	V
Produto					
Leite cru	<i>S. aureus</i> (2); <i>S. intermedius</i> (2).	<i>S. aureus</i> (3).	<i>S. aureus</i> (4); <i>S. haemolyticus</i> (1) <i>S. xylosus</i> (1).	<i>S. aureus</i> (5); <i>S. caprae</i> (1); <i>S. hyicus</i> (2).	<i>S. aureus</i> (2); <i>S. caprae</i> (1); <i>S. xylosus</i> (1).
Leite pasteurizado	<i>S. cohnii cohnii</i> (1); <i>S. lentus</i> (2).	<i>S. capitis</i> (1).	ND	<i>S. saprophyticus</i> (1)	ND
Coalhada	<i>S. saprophyticus</i> (1); <i>S. xylosus</i> (1).	<i>S. hominis</i> (2).	NI	<i>S. caprae</i> (1); <i>S. epidermidis</i> (1).	ND
Queijo	<i>S. xylosus</i> (3).	<i>S. epidermidis</i> (2); <i>S. xylosus</i> (1).	<i>S. aureus</i> (1); <i>S. epidermidis</i> (1); <i>S. haemolyticus</i> (1)	<i>S. cohnii cohnii</i> (1); <i>S. epidermidis</i> (3).	<i>S. aureus</i> (2); <i>S. lentus</i> (1).
Equipamento e utensílio					
Tanque de recepção	<i>S. lentus</i> (1); <i>S. xylosus</i> (1).	<i>S. cohnii cohnii</i> (1); <i>S. epidermidis</i> (1).	<i>S. caprae</i> (2).	<i>S. caprae</i> (2).	<i>S. xylosus</i> (1).
Tubulação do pasteurizador	ND	NI	ND	<i>S. saprophyticus</i> (1)	ND
Tanque de coagulação	ND	<i>S. lentus</i> (2).	ND	NI	ND
Lira vertical	<i>S. xylosus</i> (2).	ND	ND	ND	ND
Lira horizontal	<i>S. xylosus</i> (1).	ND	ND	ND	ND
Mesa de enformagem	ND	<i>S. saprophyticus</i> (1); <i>S. xylosus</i> (1).	NI	<i>S. epidermidis</i> (1)	<i>S. aureus</i> (1).
Prateleira da câmara de maturação	ND	NI	<i>S. xylosus</i> (1).	ND	ND
Prateleira da sala de embalagem	ND	<i>S. lentus</i> (1).	<i>S. epidermidis</i> (2).	<i>S. epidermidis</i> (1)	ND
Prateleira da câmara de estocagem	<i>S. xylosus</i> (1).	NI	ND	<i>S. epidermidis</i> (1)	ND
Luvas de manipulador					
Luva do manipulador I	ND	NI	NI	<i>S. saprophyticus</i> (1)	ND
Luva do manipulador II	<i>S. epidermidis</i> (2).	NI	<i>S. aureus</i> (1).	ND	<i>S. aureus</i> (1).
Luva do manipulador III	ND	ND	ND	<i>S. saprophyticus</i> (1)	<i>S. aureus</i> (1).

ND: não detectado

NI: não identificado

Observou-se que as espécies de *Staphylococcus* identificadas na linha de produção do queijo de coalho foram bastante diversificadas. Entre os 102 isolados característicos de *Staphylococcus* sp. avaliados foram identificadas 12 espécies, sendo três coagulase positiva e nove coagulase negativa. Aproximadamente

18,0% (17/102) dos isolados não apresentaram identificação conclusiva pelo sistema de identificação *API*[®] *Staph* (BioMérieux). No sistema de identificação *API*[®], a identificação fenotípica de um microrganismo é considerada confiável quando a probabilidade de acerto na identificação for $\geq 75\%$ e a especificidade $\geq 0,5$.

No leite cru, foram identificadas seis espécies de *Staphylococcus*, sendo três coagulase positiva e três coagulase negativa. Porém, observou-se alta frequência de espécies coagulase positiva, com prevalência de *S. aureus* em 67% (16/24) dos isolados, *S. intermedius* em 8% (2/24) e *S. hyicus* em 8% (2/24). Apenas 17% (4/24) dos isolados eram espécies coagulase negativa. Já no leite pasteurizado foram identificadas as espécies *S. capitis*, *S. cohnii cohnii*, *S. lentus* e *S. saprophyticus* e, na coalhada, as espécies *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. hominis*; *S. saprophyticus* e *S. xylosus*, todas coagulase negativa. No queijo, entre os 16 isolados obtidos, foram identificadas seis espécies, com prevalência de *S. epidermidis* em 37,5% (6/16) dos isolados, *S. xylosus* em 25% (4/16), *S. aureus* em 18,8% (3/16), *S. cohnii cohnii* em 6,2% (1/16), *S. haemolyticus* em 6,2% (1/16) e *S. lentus* em 6,3% (1/16). Houve alta frequência (81,3%) de espécies coagulase negativa (5/6) e baixa frequência (18,7%) de espécies coagulase positiva (1/6) nas amostras. A presença de *S. aureus* foi constatada em 12% (3/25) dos queijos analisados.

Os resultados obtidos neste estudo, para o leite cru, foram similares aos observados por Lamaita e outros (2005) que identificaram oito espécies de *Staphylococcus*, com alta frequência de espécies coagulase positiva, tais como *S. aureus* (34,6%), *S. hyicus* (22,7%) e *S. intermedius* (3,2%) isoladas de leite cru refrigerado. Espécies coagulase negativa (*S. epidermidis*, *S. sciuri* e *S. cohnii*) também foram identificadas, mas em menor frequência (31%). Em um estudo similar com queijo de leite de cabra, Vernozy-Rozand e outros (1996a) isolaram 133 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa e 18 cepas coagulase positiva. Entre as cepas coagulase negativa foram identificadas 14 espécies, sendo três

das quais predominantes: *S. simulans*, *S. epidermidis* e *S. xylosus*. Todas as cepas coagulase positiva pertenciam à espécie *S. aureus*. De Luca, Zanetti e Stampi (1997) isolaram 313 cepas de *Staphylococcus* sp. de 135 amostras de diferentes tipos de queijos e as espécies de maior ocorrência foram *S. epidermidis* (45,9%), *S. hominis* (42,2%), *S. xylosus* (44,4%) e *S. cohnii* (37,8%).

Na linha de produção foram analisados 27 isolados *Staphylococcus* sp. provenientes das superfícies de equipamentos e utensílios, em nove pontos da linha. Foram identificadas sete espécies, sendo seis coagulase negativa e uma coagulase positiva (*S. aureus*). Houve alta prevalência de espécies coagulase negativa, 96% (26/27) dos isolados. *S. aureus* foi identificado em apenas 4% (1/27) dos isolados. Sua ocorrência foi verificada somente em um móvel (mesa de enformagem).

Os resultados obtidos neste estudo apresentaram grande similaridade com os relatados por Brabes e outros (2003) que avaliaram 40 cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de superfícies de equipamentos em uma indústria de laticínios em Viçosa – MG. Os autores também identificaram sete espécies, com alta frequência de cepas coagulase negativas (6/7) e uma cepa coagulase positiva de *S. aureus*.

Nas luvas utilizadas pelos manipuladores foram identificadas tanto espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva quanto negativa. Porém, houve prevalência da espécie coagulase positiva *S. aureus*, a qual foi identificada em 42,8% (3/7) dos isolados, seguida das espécies coagulase negativa *S. epidermidis* em 28,5% (2/7) e *S. saprophyticus* em 28,5% (2/7). Considerando-se que *S. aureus* pode ser encontrado numa frequência que varia de 30 a 50% dos indivíduos sadios (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003), o manipulador torna-se uma importante fonte de disseminação desta bactéria em alimentos, principalmente, nos produtos de laticínios. Em pesquisa similar realizada por Brabes e outros (2003), foram isoladas 51 cepas de *Staphylococcus* sp. das mãos de manipuladores, de uma

indústria de laticínios. As espécies e os respectivos percentuais encontrados foram *S. aureus* (21,6%), *S. epidermidis* (19,6%), *S. xylosus* (17,6%), *S. warneri* (11,7%), *S. chromogenes* (7,8%), *S. saprophyticus* (5,9%), *S. lentus* (3,9%), *S. cohnii cohnii* (2,0%), *S. haemolyticus* (2,0%), *S. hominis* (2,0%) e cepas sem identificação conclusiva (5,9%). Em outro estudo, Nassu e outros (2002) relataram a importância do monitoramento e controle das condições higiênicas dos funcionários ao constatarem redução no nível de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva nas mãos de manipuladores alimentos, após a implantação das BPF. Pinto e Bergman (2003) relataram que manipuladores haviam sido incriminados em 11,4% das enfermidades transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul – RS, no período de 1988 a 1997.

A prevalência de espécies de *Staphylococcus* não produtores de coagulase, com potencial enterotoxigênico, como *S. capitis*, *S. caprae*, *S. cohnii cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* e *S. xylosus*, nas amostras da linha de produção de queijo de coalho, pode representar um risco em potencial de produção de enterotoxinas no produto final, sob condições adequadas de temperatura, pH, disponibilidade de oxigênio, atividade de água e concentração de cloreto de sódio. Portanto, recomenda-se que a presença de espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa não sejam ignoradas em investigações de casos suspeitos de intoxicação estafilocócica, uma vez que este grupo de patógenos, estando presente no alimento, oferece risco de causar intoxicação ao consumidor.

Brabes e outros (2003) avaliaram 116 cepas de *Staphylococcus* produtoras e não produtoras de coagulase, isoladas de equipamentos e utensílios, manipuladores e ar ambiente em uma indústria de laticínios, e verificaram que apenas 17 (14,6%) apresentaram produção de enterotoxinas. Das 17 cepas produtoras, nenhuma pertencia à espécie *S. aureus* e, 13 (76, 5%) apresentaram produção de quatro tipos de enterotoxinas simultaneamente (SEA, SEB, SEC e SED). Udo e outros (1999) isolaram *Staphylococcus* coagulase negativa com

potencial enterotoxigênico em manipuladores de restaurantes e, relataram que estas cepas poderiam provocar intoxicação se contaminassem os alimentos.

Oliveira (1999) avaliou a produção de enterotoxinas por 10 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa com potencial enterotoxigênico, pertencentes às espécies *S. epidermidis* (3), *S. chromogenes* (1), *S. hominis* (1), *S. hyicus* (1), *S. warneri* (2) e *S. xylosus* (2), crescidas em leite em pó desnatado e presunto cozido. No leite, o crescimento das cepas inoculadas foi progressivo e, após 12 horas de incubação a 37°C, a população alcançou níveis entre 10⁶ e 10⁷UFC/mL. Das dez cepas estudadas, apenas *S. chromogenes* e *S. warneri* de origem bovina foram capazes de produzirem enterotoxinas nos alimentos. Em estudo similar, Pereira, Carmo e Pereira (2001) verificaram o desenvolvimento de 14 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa, com potencial enterotoxigênico, em leite tipo *longa vida* e presunto cozido, mas não houve produção de enterotoxinas nos alimentos inoculados.

Os resultados da pesquisa de enterotoxina estafilocócica nas amostras de leite cru, leite pasteurizado, coalhada e queijo são apresentados na **Tabela 15**.

Tabela 15. Detecção imunoenzimática (ELFA - VIDAS® *Staph enterotoxin II*) de enterotoxina estafilocócica em uma linha de produção de queijo coalho.

Amostra	Lote				
	I	II	III	IV	V
Leite cru	-	-	+	-	-
Leite pasteurizado	-	-	+	-	-
Coalhada	-	-	+	-	-
Queijo	-	-	+	-	-

+ : Presença
 -: Ausência

A presença de enterotoxina foi constatada em 20% (4/20) das amostras analisadas. Todas as amostras contaminadas (4) eram oriundas do processamento III (**Tabela 12**), no qual enterotoxinas foram detectadas no leite cru e, conseqüentemente, também detectadas no leite pasteurizado, na coalhada e no queijo obtido a partir desse leite. Esse resultado era esperado, uma vez que a pasteurização não inativa enterotoxinas estafilocócicas devido a sua termorresistência. Após a pasteurização, a população de *Staphylococcus* sp. reduziu para menos de 10^3 UFC/mL, tanto no leite pasteurizado como na coalhada. No entanto, no queijo a população variou entre $9,8 \times 10^1$ a $2,6 \times 10^3$ UFC/g (**Tabela 12**), com a confirmação de *S. aureus*, indicando contaminação pós-pasteurização em função da manipulação durante o processamento.

A ocorrência de enterotoxina na linha de produção de queijo de coalho pode ser atribuída à elevada população de *Staphylococcus* sp. ($1,5 \times 10^7$ UFC/mL) e *Staphylococcus* produtores de coagulase ($5,0 \times 10^6$ UFC/mL) detectada no leite cru (**Tabela 12**), associada à ocorrência de espécies de *Staphylococcus* enterotoxigênicos, tais como *S. aureus*, *S. haemolyticus* e *S. xylosus* (**Tabela 14**).

A ocorrência de enterotoxinas estafilocócicas em produtos lácteos parece estar mais relacionada à habilidade das cepas em produzir enterotoxinas, do que ao nível de contaminação por *Staphylococcus*. Rapini e outros (2002) evidenciaram a produção de enterotoxina (SEC), com contagens de *Staphylococcus* sp. em torno de 10^4 UFC/g., em queijo de coalho comercializado nas praias do Nordeste do Brasil. No entanto, a presença de enterotoxinas não foi detectada em 43 amostras de queijo de coalho com elevada população ($4,4 \times 10^4$ a $5,9 \times 10^7$ UFC/g) de *Staphylococcus* produtores de coagulase, produzido no Ceará (LIMA, 2005). Em outro estudo, a presença de enterotoxinas também não foi detectada em queijos artesanais da região do Serro, em Minas Gerais, com contagens de $1,0 \times 10^7$ UFC/g de *S. aureus* (PINTO *et al.*, 2004).

4. CONCLUSÕES

A contaminação do leite cru por *Staphylococcus* coagulase positiva, principalmente *S. aureus* e *S. intermedius*, encontra-se em nível que podem permitir a produção de enterotoxinas estafilocócicas.

A constatação da presença de enterotoxinas clássicas (A, B, C, D e E) nas amostras do processamento III indica que as enterotoxinas estafilocócicas, uma vez presentes em leite cru, não são inativadas pelo processo de pasteurização e permanecem no leite pasteurizado, na coalhada e, conseqüentemente, no queijo, tornando o mesmo um risco a saúde do consumidor. Além disso, indica contaminação na linha de produção do queijo de coalho, possivelmente devido a não adoção ou falhas das Boas Práticas de Fabricação desde a obtenção do leite até o produto final (queijo).

5. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo 502929/2003-0) pelo suporte financeiro. À Embrapa Agroindústria Tropical e à Embrapa Gado de Leite pelo apoio técnico durante a execução da pesquisa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 10 jan. 2001b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>>. Acesso em: 07 fev. 2006.

ADESIYUN, A. A.; TATINI, S. R.; HOOVER, D. G. Productions of enterotoxins by *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, Shannon, v. 9, n. 5, p. 487-495, Sept., 1984.

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

ALTEKRUSE, S. F.; TIMBO, B. B.; MOWBRAY, J.C.; BEAN, N. H.; POTTER, M. E. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 7, p. 709-725, July, 1998.

ANDRADE, N. J.; SILVA, R. M. M. da; BRABES, K. C. S. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. **Ciências Agrotecnicas**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 590-595, maio/jun., 2003.

ARAÚJO, V. S.; PAGLIARES, V. A.; QUEIROZ, M. L. P.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio the Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, n. 06, p. 1172-1177, May, 2002.

ASAO, T; KUMEDA, Y.; SHIBATA, T.; ODA, H; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**, London, v. 130, n. 1, p. 33-40, Jan., 2003.

ASSUMPÇÃO, E G.; PICCOLI-VALLE, R. H.; HIRSCH, D.; ABREU, L. R. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 3, p. 366-370, Jun., 2003.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase positive *Coci* that grow aerobically. In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8th ed. Washington: ASM, 2003. v. 1, Chap. 28, p. 384-404.

BECKER, K.; KELLER, B.; von EIFF, C.; BRUCK, M.; LUBRITZ, G.; ETIENNE, J.; PETERS, G. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 12, p. 5551-5557, Dec., 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, n. 95, p. 44-47, abr., 2001.

BENNET, R.W. Atypical toxigenic *Staphylococcus* and non-*Staphylococcus aureus* species on the horizon? An update. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 10, p. 1123-1126, Oct., 1996.

BENNETT, R.W.; LANCETTE, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: Food Drug Administration (Ed.). **Bacteriological analytical manual online**. 8rd ed. Gaithersburg: AOAC International, 2001. Chap. 12. p. 12.1-12.5. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>>. Acesso em: 27 Ago. 2005.

BLAIOTTA, G.; ERCOLINE, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. Strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seL in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 97, n. 5, p. 719-730, May, 2004.

BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, E. H. F de; FIGUEIREDO, E. A. T. de. Microrganismos patogênicos e em queijo de coalho

produzido no Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 31-40, jan./jun., 2003.

BRABES, K C. S.; ANDRADE, N. J.; MENDONÇA, R. C. S.; LIMA, J. C.; LOPES, F. A. Identificação e classificação de enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus* spp. isolados de ar de ambiente, manipuladores e de superfícies em uma indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 58, n. 333, p. 33-38, jul./ago. 2003.

BRECKINRIDGE, J. C.; BERGDOLL, M. S. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin producing *Staphylococcus*. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 284, n. 10, p. 541-543, Oct., 1971.

BRUM, J. V. F.; GONÇALVES, N. B.; MASSON, M. L. Condições higiênicas de mãos de manipuladores de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 179-182, jul./ago., 2004.

BRUNO, L. M.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; CARVALHO, J. D.G.; ANDRADE, A. P. Avaliação microbiológica de queijo de coalho artesanais e industrializados comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n. 345, p. 217-220, jul./ago, 2005.

CARELI, R. T.; DIAS, A. S.; ANDRADE, N. J.; ANTUNES, M. A. Qualidade de água e condições higiênicas de manipuladores, equipamentos e utensílios em micro-indústrias de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, MG, v. 58, n. 333, p. 85-88, jul./ago., 2003.

CARMO, G. M. I.; OLIVEIRA, A. A.; DIMECH, C. P.; SANTOS, D. A.; ALMEIDA, M. G.; BERTO, L. H.; ALVES, R. M. S.; CARMO, E. H. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico** - Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, ano 5, n. 6, p. 1-7, dez., 2005. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf>.

Acesso em: 19 jul. 2006.

CARMO, L. S. Intoxicação alimentar. **Revista Minas faz Ciências**, Belo Horizonte, n. 11, p. 1-2, jun./ago, 2002. Disponível em:

<<http://revista.fapemig.br/11/index.html>>. Acesso em: 27 abr. 2006.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; ANUNCIAÇÃO, L. L. C.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning in Minas Gerais State (Brazil). **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária**, Belo Horizonte, v. 47, n. 2, p. 113-122, jan./mar., 1995.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, London, v. 19, n. 1, p. 9-14, Jan./Feb., 2002.

CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo Minas Frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas**. 2003. 107p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CEARÁ (Estado). Secretaria da Saúde do Estado do Ceará. Núcleo de Epidemiologia. Célula de Vigilância Epidemiológica. **Informe anual de surtos das doenças transmitidas por alimentos**. Fortaleza, 2004. 4p.

CENCI-GOGA, B. T.; KARAMA, M.; ROSSITTO, P. V.; MORGANTE, R. A.; CULLOR, J. S. Research Note Enterotoxin Production by *Staphylococcus aureus* Isolated from mastitic cows. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 9, p. 1693–1696, Sept., 2003.

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

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

DE LUCA, G.; ZANETTI, F.; STAMPI, S. *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 267-270, Apr., 1997.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Minneapolis, v. 13, n. 1, p. 16-34, Jan., 2000.

EVANCHO, G. M.; SVEUM, W. HL. J.; FRANK, J. F. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: DOWNES, F.P.; ITO, H. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington D. C.: American Public Health Association, 2001. Chap. 3. p. 25-35.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F de; NASSU, R. T; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, set./dez., 2003.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) / WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Statistical information on food-borne disease in Europe microbiological and chemical hazards. In: PAN-EUROPEAN CONFERENCE ON FOOD SAFETY AND QUALITY, 1, 2002, Budapest. [**Proceeding**]. Roma: FAO/WHO, 2002. 15p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/004/y369e/y369e00.pdf>. Acesso em: 07 Fev. 2006.

GOMES, H. A.; GALLO, G. R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo minas frescal comercializados em Piracicaba - SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 158-161, jul./dez., 1995.

HARVEY, J.; GILMOUR, A. *Staphylococcus aureus*. In: ROBINSON, R.; BATT, C. A.; PATEL, P. D. (Ed.). **Encyclopedia of food microbiology**. London: Academic Press, 2000. v. 3. p. 2066-2071.

HOLECKOVÁ, B.; HOLODA, E.; FOTTA, V.; KALINÁCOVÁ, V.; GONDOL, J.; GROLMUS, J. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Lublin, v. 9, n. 3, p. 179-182, Mar., 2002.

INSTITUTO PANAMERICANO DE PROTECCIÓN DE LOS ALIMENTOS Y ZOONOSIS (INPPAZ) / ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS) / ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Vigilancia Epidemiológica. Sistema de información regional para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos [SIRVETA]. Disponível em: <http://www.panalimentos.org/sirveta/e/salida2.asp>. Acesso em: 14 Jul. 2006.

JABLONSKI, L. M.; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. 2nd ed., Washington D. C.: ASM, 2001. Chap. 19, p.411-434.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *cgc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 166, n.1, p. 669-677, Jan., 2001.

KHAMBATY, F. M.; BENNET, R.W.; SHAH, D. B. Application of pulse field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. **Epidemiology and Infection**, London, v. 113, n. 1, p. 75-81, Jan., 1994.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária de Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 5, p. 702-709, maio, 2005.

LECLERC, V.; DUFOUR, B.; LOMBARD, B.; GAUCHARD, F.; GARIN-BASTUJI, B.; SALVAT, G.; BRISABOIS, A.; POUMEYROL, M.; DE BUYSER, M.L.; GNANOU-BESSE, N.; LAHELLEC, C. Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. **Livestock Production Science**, Paris, v. 76, n. 3, p. 195-202, Sept., 2002.

LEITE JÚNIOR, A. F. S.; FLORENTINO, E. R.; OLIVEIRA, E. B. D.; TORRANO, A. D. M. Qualidade microbiológica do “queijo de coalho” comercializado a temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande - PB. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 73, p. 53-59, jun., 2000.

LEITE, M. M.; LIMA, M. G.; REIS, R. B. dos. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas tipo Frescal. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 122, p. 89-93, jun., 2005.

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

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 95, n. 1, p. 38-43, Jan., 2003.

LIMA, A. F. ***Staphylococcus coagulase positiva e enterotoxinas em queijo de coalho***. 2005. 86p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

LONCAREVIC, S.; JORGENSEN, H. J.; LOVSETH, A.; MATHISEN, T.; ROVIK, L. M. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 98, n. 3, p. 344-350, Mar., 2005.

MACHADO, G. C.; CHAVES, J. B. P. Estratégias para implantação de um sistema de qualidade em indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 311, n. 54, p. 1-50, jan./mar., 1999.

MARTIN, S. E.; MYERS, E.R.; LANDOLO, J. J. *Staphylococcus aureus*. In: HUI, Y.H.; PIERSON, M.D.; GORHAM, J.R. (Ed.). **Foodborn disease handbook – bacterial pathogens**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2001. v. 1. Chap. 15, p. 345-381.

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

MENDES, E. S.; LIMA, E. C.; NUMERIANO, A. K. M.; COELHO, M. I. S. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* e coliformes em queijos de "coalho" comercializadas em Recife. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 66/67, p. 122-126, nov./dez. 1999.

MEYRAND, A.; VERNOSY-ROZAND, C. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in different cheeses. **Revue Medicine Veterinaire**, Paris, v. 150, n. 7, p. 601-616, jul., 1999.

NASCIMENTO, I. R.; SOBRINHO, D. C. dos S.; OLIVEIRA, E. C. de; FREITAS, M. S.; ARAGÃO, I. N. Qualidade microbiológica do queijo de coalho submetido a tratamento térmico comercializado em Aracaju - SE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 345, n. 60, p. 253-2, jul./ago, 2005.

NASSU, R. T.; BENEVIDES, S. D.; BORGES, M. F.; SILVA, J. B.; LEITE, A. I. N. Implantação de Boas Práticas de fabricação em uma indústria de laticínios no estado do Rio Grande do Norte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 327, n. 57, p. 12-17, jul./ago., 2002.

NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES (NIID). *Staphylococcus* food poisoning in Japan. **Infectious Agents Surveillance Report**, Tokyo, v. 22, n. 258, p. 185-186, Aug., 2001.

NICOLAU, E. S.; KUAYE, A. Y.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, G. R. Avaliação do potencial de produção e tipo de enterotoxinas estafilocócicas encontradas em linhagens de *Staphylococcus aureus* em extratos de amostras de queijo tipo mussarela fabricado na região de Goiânia - GO. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 56, n. 321, p. 92-101, jul./ago, 2001.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASLELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BALZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON,

F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N. C.; CELANO, G. V. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 73-79, Jan., 2005.

OLIVEIRA, A. M. **Investigação do comportamento de estafilococos enterotoxigênicos coagulase negativos, em alimentos**. 1999. 102p. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) – Departamento de Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

OLSEN, S. J.; MACKINON, L. C.; GOUDING, J. S.; BEAN, N. H.; SLUTSKER, L. Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, n. SS01, p.1-51, Mar., 2000.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 246, n. 2, p. 191-198, May, 2005.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin- related putative toxin encoded by to kinds of plasmids. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 6, p. 6088-6094, June, 2003.

OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; YU, S.; HU, D.L.; UEDA, S.; SHINAGAWA, K. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productive of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington v. 40, n. 3, p. 857-862, Mar., 2002.

OMORI, G.; KATO, Y. A staphylococcal food-poisoning caused by a coagulase-negative strain. **Biken's Journal**, Berlin, v. 2, p. 92- 92, Jan., 1959.

ORWIN, P. M.; FITZGERALD, J. R.; LEUNG, D. Y. M.; GUTERREZ, J. A.; BOACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 2, p. 2916--2919, Feb., 2003.

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, n. 61, p. 33-37, jan./fev., 1999.

PEREIRA, M. L.; CARMO, J. S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas, em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 171-175, maio/ago., 2001.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; SANTOS, E. J.; PEREIRA, J. L.; BERGDOLL, M. S. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 5, p. 559-561, May, 1996.

PEREIRA, K. S.; PEREIRA, J. L. Estafilococos coagulase negativa: potenciais patógenos em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 129, p. 32-34, mar., 2005.

PINTO, A. T.; BERGMANN, G. P. Fatores predisponentes da ocorrência de enfermidades transmitidas por alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 104/105, n. 17, p. 153-154, jan./fev., 2003.

PINTO, M. S.; MARTÍNS, J. M.; ARAÚJO, R. A. B. M.; PIRES, A. C. S.; DUARTE, G. K.; CUNHA, L. R; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Diagnóstico sócio-

econômico e cultural dos produtores e avaliação microbiológica do queijo minas artesanal da região do Serro – MG. **Revista do Instituto de laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 86-92, jul./ago., 2004.

RAPINI, L. S.; FEIJÓ, L. D.; VERAS, J. F.; NASCIMENTO, K. F.; AMADO, J. B.; COUTO, I. P.; CARMO, L. S.; SILVA, M. C. C.; CERQUIRA, M. M. O. P. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Listeria* sp. e *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo tipo coalho. **Revista do Instituto de laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 60-65, jul./ago., 2002.

RODRIGUEZ, L.; NUNEZ, F.; CORDOBA, J. J.; BERMUDEZ, E.; ASNSIO, M. A. Gram-positive, catalase cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 6, p. 1897-1902, June, 1996.

ROSEC, J. P.; GUIRAUD, J. P.; DALET, C.; RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 213-221, Mar. 1997.

SABIONI, J. G.; HIROOKA, E.L.; SOUZA, M.L.R. Intoxicação alimentar por queijo “Minas” contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista da Saúde Pública**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 458-461, out., 1988.

SABIONI, J. G.; NASCIMENTO, D.; PEREIRA, J. L. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo “Minas” em Ouro Preto, Minas Gerais, 1992. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 8, n. 33, p. 22-23, jan., 1994.

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA (SDA). Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de manteiga da terra, queijo de coalho e queijo de manteiga. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 16 jul. 2001a. Disponível em:

<<http://200.252.165.21/sda/dipoa/instnorm30aiirtqueijomanteiga.htm>>.

Acesso em: 28 jan. 2006.

SENA, M. J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp. isolados de queijos de coalho comercializados em Recife-PE.** Belo Horizonte – MG., 2000. 75p. Tese (Doutora em veterinária) - Faculdade de veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

SU, Y.; WONG, A. C. L. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 2, p. 195-202, Feb., 1997.

UDO, E. E.; AL-BUSTAN, M. A.; JACOB, L. E.; CHUGH, T. D. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait city may be a potential cause of food poisoning. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 48, n. 9, p. 819-823, Sept., 1999.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Economic Research Service. **Economics of foodborne disease: food and pathogens.**

Disponível em:

<<http://www.ers.usda.gov/Briefing/FoodboeneDisease/foodandpathogens.htm>>.

Acesso em: 12 May 2006.

VANZO, S. P.; AZEVEDO, R. V. P. Detecção de *S. aureus* em manipuladores de alimentos – perfil de resistência a antibióticos e quimioterápicos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104/105, p. 114-123, jan./fev., 2003.

VERAS, J. F.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; FERNANDES, T. M. G.; AZALIM, C. C.; SILVA, M. C. C.; MARTNS, R. T.; CERQUEIRA, M. M.O.P. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no

estado de Minas Gerais. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104/105, p. 218-119, jan./fev., 2003.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PERRIN, G.; HAOND, F.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Identification *Micrococcaceae* isolated from goat's milk and cheese in the Poitou-Charentes region. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 373-378, Mar., 1996a.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococcal isolated from goats and cheese. . **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 271-280, Mar., 1996b.

CAPÍTULO IV

IDENTIFICAÇÃO DE *S. aureus* UTILIZANDO A TÉCNICA DE PCR PARA O GENE *femA* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO DE ISOLADOS DE *Staphylococcus* spp. ATRAVÉS DA AMPLIFICAÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE ENTEROTOXINAS

Identificação de *S. aureus* utilizando a técnica de PCR para o gene *femA* e avaliação do potencial enterotoxigênico de isolados de *Staphylococcus* spp. através da amplificação de genes codificadores de enterotoxinas

RESUMO

O objetivo da pesquisa foi avaliar o emprego de técnica molecular na identificação de *S. aureus* e avaliar o potencial enterotoxigênico de cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas em uma linha de produção de queijo de coalho, através da técnica PCR e PCR Multiplex. A identificação das 23 cepas de *S. aureus* foi realizada através da amplificação de um fragmento de 132 pares de bases do gene *femA*. O potencial enterotoxigênico das 32 cepas de *Staphylococcus* spp. foi determinado através da amplificação dos genes codificadores de enterotoxina estafilocócicas *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sei* e *sej*. De um total de 23 cepas de *S. aureus* previamente identificadas pelo *API[®] Staph* (BioMérieux), 82,6% (19/23) foram positivas para o gene *femA*; demonstrando maior especificidade e poder discriminatório da análise molecular. A presença dos genes *sea* e *sec* foi detectada em 37,5% (12/32) em cinco espécies de *Staphylococcus*. A alta frequência (37,5%) de cepas não produtoras de coagulase, com potencial enterotoxigênico detectada na linha de produção de queijo de coalho, indica a necessidade de uma reavaliação dos padrões microbiológicos, estabelecidos pela Legislação Brasileira, para *Staphylococcus* enterotoxigênico em alimentos, que até o momento, correlacionam à produção da enzima coagulase com a capacidade de produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* spp.

Palavras-chave: *Staphylococcus* spp., enterotoxinas estafilocócicas, PCR

1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos alimentos por *Staphylococcus* enterotoxigênicos produtores e não produtores de coagulase representam um problema de saúde pública, pelo risco de causar intoxicação alimentar estafilocócica aos consumidores (MARTIN; MYERS; LANDOLO, 2001). A intoxicação ocorre após a ingestão de alimentos contendo enterotoxinas e, os sintomas, incluem náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia. Algumas vezes, dor de cabeça e queda da pressão arterial também podem ocorrer.

Entre os alimentos envolvidos em surtos e casos de intoxicação estafilocócica, leite cru, leite pasteurizado e queijos são os produtos lácteos mais incriminados sendo *S. aureus* o agente etiológico mais freqüente nas investigações epidemiológicas (EVERSON *et al.*, 1988; DE BUYSER *et al.*, 2001; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; IKEDA *et al.*, 2005).

As enterotoxinas estafilocócicas são exoproteínas, que acreditava-se inicialmente serem apenas produzidas por cepas de *S. aureus* e, mais recentemente, por algumas cepas de outras espécies produtoras de coagulase, como *S. intermedius* (HIROOKA *et al.*, 1988; BECKER *et al.*, 2001) e *S. hyicus* (ADESIYUN; TATINI; HOOVER, 1984). Além disso, a produção de enterotoxinas por cepas de *Staphylococcus* não produtores de coagulase tem sido relatada em vários estudos (VERNOZY-ROZAND *et al.*, 1996a; CHENG-CHUN; LI-FEN, 1997; PEREIRA; CARMO; PEREIRA, 2001). Na literatura há registro de três surtos de intoxicação estafilocócica associados a espécies coagulase negativa (OMORI; KATO, 1959; BRECKINRIDGE; BERGDOLL, 1971; CARMO *et al.*, 2002; VERAS *et al.*, 2003).

As enterotoxinas estafilocócicas pertencem à grande família das toxinas extracelulares estafilocócicas, também conhecidas como toxinas pirogênicas superantígenos (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000), que compartilham

relações filogenéticas, estrutura, função e seqüência homóloga (BALABAN; RASOOLY, 2000; JABLONSKI; BOHACH, 2001). Estas toxinas pirogênicas estão envolvidas nas intoxicações alimentares e causam síndromes do choque tóxico, TSST-1 (BALABAN; RASOOLY, 2000). São termoestáveis, hidrossolúveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, permanecendo ativas após a ingestão (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

As enterotoxinas são nomeadas com as letras do alfabeto, de acordo com a ordem cronológica de suas descobertas. Até o momento, já foram identificados 20 tipos de enterotoxinas sorologicamente distintas, mas com similaridade na estrutura e seqüência (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; JABLONSKI; BOHACH, 2001). Embora as enterotoxinas sejam similares em sua composição e atividade biológica, são identificadas separadamente em função de suas diferenças antigênicas.

Diferentes enterotoxinas estafilocócicas têm sido descritas nas últimas décadas. os tipos clássicos SEA, SEB, SEC_{1, 2, 3}, SED E SEE são consideradas as de maior ocorrência (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; MARTIN; MYERS; LANDOLO, 2001). Outras quatro enterotoxinas, SEG, SEH, SEI e SEJ, foram identificadas e seus genes (*seg*, *seh*, *sei*, *sej*) correspondentes descritos (BETLEY; BORST; REGASSA, 1992; REN *et al.*, 1994; SU; WONG, 1995; MUNSON *et al.*, 1998; ZHANG; LANDOLO; STEWART, 1998; OMOE *et al.*, 2002). Recentemente, a lista da família de enterotoxinas foi expandida pela detecção de novos genes (*sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser* e *seu*) que codificam enterotoxinas homólogas (FITZGERALD *et al.*, 2001; JARRAUD *et al.*, 2001; KURODA *et al.*, 2001; ORWIN *et al.*, 2001; YARWOOD *et al.*, 2002; ORWIN *et al.*, 2003; LETERTRE *et al.*, 2003; OMOE *et al.*, 2003; OMOE *et al.*, 2005). Além disso, para SEC, SEG, SEI, e SEU já têm sido relatadas algumas variantes (SEC_v, SEG_v, SEI_v, E SEU_v) (MARR *et al.*, 1993; ABE *et al.*, 2000; OMOE *et al.*, 2003; LETERTRE *et al.*, 2003; BLAIOTTA *et al.*, 2004).

As enterotoxinas estafilocócicas são codificadas por genes presentes em bacteriófagos, SEA e SEE (BETLEY; MEKALANOS, 1985; COUCH; SOLTIS; BETLEY, 1988; KURODA *et al.*, 2001), SED (BAYLES; IANDOLO, 1989) e SEJ (ZHANG; IANDOLO; STEWART, 1998) por genes presentes em plasmídios, SEH e SEP (SU; WONG, 1995; KURODA *et al.*, 2001) no cromossomo e SEB, SEC, SEG, SEGV, SEI, SEI_v, SEM, SEM, SEO, SEK, SEL e SEQ (JARRAUD *et al.*, 1999; KURODA *et al.*, 2001; BABA *et al.*, 2002; YARWOOD *et al.*, 2002; BLAIOTTA *et al.*, 2004) em ilhas de patogenicidade cromossomal.

A relação entre as novas enterotoxinas e a intoxicação estafilocócica veiculada por alimentos, ainda não está completamente elucidada. Há poucos relatos sobre a detecção das novas enterotoxinas em cepas de *Staphylococcus*, principalmente *S. aureus*, isolados de alimentos (ROSEC; GIGAUD, 2002; LONCAREVIC *et al.*, 2005; JØRGENSEN *et al.*, 2005). Esta escassez de dados pode ser atribuída à falta de testes imunológicos disponíveis para detecção destas enterotoxinas em alimentos. Por outro lado, há grande disponibilidade de técnicas para detecção, discriminação e quantificação das enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC_{1, 2, 3}, SED e SEE) e, os relatos sobre a ocorrência destas enterotoxinas em alimentos são numerosos (DE LUCA; ZANETTI; STAMPI, 1997; ROSEC *et al.*, 1997; MEYRAND; VERNOSY-ROZAND, 1999; SORIANO *et al.*, 2002; CHAPPAVAL, 2003; NORMANNO *et al.*, 2005).

Rosec e Gigaud (2002) avaliaram 258 cepas de *Staphylococcus* isoladas de vários alimentos na França, quanto à presença de nove genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej*) codificadores de enterotoxinas pela técnica PCR. As cepas foram constituídas na sua maioria por *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa, incluindo 118 cepas isoladas de queijos. Das 258 cepas isoladas 155 foram positivas para um ou mais genes dos nove genes estudados. Os genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* foram detectados em 147 cepas, enquanto os genes das enterotoxinas clássicas foram constatados em apenas 76 cepas, evidenciado a ocorrência das novas enterotoxinas em 94,8% das cepas enterotoxigênicas.

Mclauchlin e outros (2000) avaliaram a ocorrência de oito genes de enterotoxinas em 129 cepas de *S. aureus*, incluindo 39 cepas isoladas de 38 alimentos suspeitos de envolvimento em casos de intoxicação alimentar na Inglaterra e, detectaram fragmentos dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh* e *sei* em 38 cepas de *S. aureus* analisadas pela multiplex PCR, recuperadas de 32 dos 38 alimentos pesquisados, sendo que 17 deles estavam associados com os genes *see*, *seg*, *seh* e *sei*, e, os outros 15, associados aos genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed*.

Chapaval (2003) pesquisou a presença de cinco genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) codificadores de enterotoxinas em *S. aureus* isolados de 132 amostras de leite oriundas dos municípios de Piracicaba - SP, Americana – SP e Rio das Pedras – SP, pela técnica PCR e, constatou que, 69,7% das amostras estavam contaminadas com cepas que abrigavam um ou mais dos cinco genes pesquisados, com prevalência do gene *sea* em 46,2% das amostras, seguido do gene *seb* e *sec*.

O gene *femA* está universalmente presente em todas as cepas de *S. aureus* (MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000) e, tem sido explorado como marcador específico na identificação desta espécie em testes baseados em pesquisa de DNA (VANNUFFEL *et al.*, 1998; MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000). Este gene faz parte dos genes *fem* (*femX*, *femA*, *femB*, *femC*, *femD* e *femE*), os quais codificam proteínas designadas de fatores essenciais para resistência a metilicina (BENSON *et al.*, 2002). A organização genômica deste gene, em algumas espécies de *Staphylococcus* como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* e *S. simulans* parece ser altamente conservada, com alternância de regiões homólogas e variáveis. Essa alternância de regiões homólogas tem sido explorada para diferenciação entre espécies de *Staphylococcus*, pela da amplificação de fragmentos com diferentes tamanhos e localização no gene, através da técnica PCR (VANNUFFEL *et al.*, 1999).

A amplificação de fragmento (132pb) do gene *femA* pela reação da polimerase em cadeia (PCR) tem sido uma ferramenta útil na identificação de espécies de *S. aureus* e uma alternativa rápida e segura para identificação molecular desta bactéria (MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000; ARCURI *et al.* 2004; LANGE *et al.* 2004; FREITAS, 2005).

A multiplex PCR consiste na amplificação simultânea de mais de um gene na mesma reação. Vários testes multiplex PCR têm sido desenvolvidos para detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas e TSST-1 (VERNOZY-ROZAND *et al.*, 1996b; BECKER; ROTH; PETERS, 1998; MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000). Monday e Bonach (1999) desenvolveram um teste de multiplex PCR para detecção dos genes *sea* até *sej* e TST. Sharma, Rees e Dodd (2000) desenvolveram outro teste multiplex PCR para genes das enterotoxinas de *S. aureus* que utiliza um *primer* universal de genes de enterotoxinas em combinação com *primers* toxina-específica, para amplificar produtos característicos de genes de enterotoxinas estafilocócicas.

O objetivo da pesquisa foi identificar isolados de *S. aureus* e avaliar o potencial enterotoxigênico de cepas de *Staphylococcus* spp., isoladas em uma linha de produção de queijo de coalho, utilizando a técnica PCR.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A identificação molecular de cepas de *S. aureus* e avaliação do potencial enterotoxigênico de cepas de *Staphylococcus* spp. foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, Minas Gerais. As cepas foram isoladas de amostras de leite cru, leite pasteurizado, coalhada, queijo, superfícies de equipamentos, móveis, utensílios e luvas utilizadas pelos manipuladores, coletadas de cinco o processamento (lotes) diferentes (I, II, III, IV e V) em 23 pontos da uma linha de produção de queijo de coalho em uma de laticínios, na região metropolitana de Fortaleza, Ceará.

2.1. Identificação de isolados de *S. aureus*

A identificação fenotípica das 23 cepas de *S. aureus* (através do *API*[®] *Staph* - *BioMérieux*) isoladas na linha de produção de queijo de coalho, foi confirmada por meio da amplificação de um fragmento de 132pb do gene *femA*, específico da espécie, por meio da técnica PCR.

Para extração do DNA foi utilizada uma colônia de cada isolado, crescida em ágar infusão de cérebro e coração (Difco) a 35°C por 24 horas e repicada em caldo infusão de cérebro e coração (Difco). Após incubação sob agitação (250 xg) a 37°C por 14-18 horas, 1,6mL da cultura transferida para tubo *Eppendorf* e centrifugada a 12.000xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com 1mL tampão TES (1X) [N-tris(hidroximetil)ácido metil 1-2-aminoetenolsulfônico] e centrifugada a 12.000xg por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado, as células ressuspensas com 500µL tampão TES (1X) e agitadas (agitador tipo *vortex*). Em seguida, foram adicionados 5µL de lisostafina (1mg/mL) e 10µL de lisostafina bruta e, após agitação e incubação a 37°C por 30 minutos, foram adicionados 20µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) a 10%. O tubo *Eppendorf* foi invertido, lentamente, várias vezes, e deixado em repouso por 15 minutos. A seguir, foram adicionados 250µL de fenol e 250µL de uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após agitação e centrifugação a 12.000 xg por 5 minutos (duas vezes), o DNA foi precipitado com isopropanol (100%), centrifugado a 12.000 xg por 30 minutos, e o sobrenadante descartado (HESSELBARTH; SCHWARZ, 1995). O *pellet* de DNA foi seco em estufa a 30°C e ressuspensado em 40µL de água Milli-Q. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (GeneQuantpro, Amersham Biociences) e a concentração ajustada para a PCR.

Na PCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores *femA1* (5'- AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG-3') e *femA2* (5'-GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG-3') (MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000) que amplificam um fragmento de 132

pares de bases do gene *femA*. A amplificação foi realizada em termociclador Thermo Hybaid (Modelo PxE Thermal Cycler - PxE 20102) utilizando uma mistura de 50µL, contendo 1X de tampão PCR, 1,5mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 20 pmol de cada oligonucleotídeos, 2,5U da enzima Taq polimerase, 100ng de DNA bacteriano completando-se o volume para 50,0µL com água Mili-Q esterilizada. As condições de amplificação utilizadas foram um ciclo inicial a 94°C por 4min, seguido de 5 ciclos (de desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 56°C por 45s e extensão a 72°C por 45s); 20 ciclos (de desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 56°C por 45s e extensão a 72°C por 45s) e um ciclo final a 72°C por 5min. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose (1,5%, p/v) corado com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v) e fotografados em foto documentador (Eagle Eye II, Stratagene). *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizado como controle positivo.

2.2. Detecção de genes codificadores de enterotoxina estafilocócicas em cepas de *Staphylococcus* spp.

O potencial enterotoxigênico de 32 cepas de *Staphylococcus*, representativas dos 23 pontos da linha de produção de queijo de coalho, foi avaliado através da técnica PCR. As 32 cepas analisadas foram selecionadas entre 85 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas e previamente identificadas pelo API[®] Staph (BioMérieux). A presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sei* e *sej* foi pesquisada em 13 cepas de *Staphylococcus* produtoras de coagulase, constituídas pelas espécies *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, e 19 cepas não produtoras de coagulase pertencentes a nove espécies.

O DNA celular foi extraído conforme descrito por Hesselbarth e Schwarz, (1995). A detecção dos genes codificadores de enterotoxinas foi realizada utilizando dois protocolos Multiplex PCR - (*sea* + *sed* + *see*) e (*seb* + *sec*) e, de outros dois PCR simples, sendo um para o gene *sei* e, o outro para o gene *sej*,

utilizando-se os oligonucleotídeos descritos por Rosec e Gigaud (2002), listados na **Tabela 16**. As reações foram realizadas sob condições descritas por Rosec e Gigaud (2002), com algumas modificações propostas por Arcuri e outros (2004).

Tabela 16. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas PCR para detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas.

Oligonucleotídeos (5'– 3')	Gene alvo	Enterotoxina Codificada	Produto amplificado	Referência
SEA1: ACG ATC AAT TTT TAC AGC SEA2: TGC ATG TTT TCA GAG TTA ATC	<i>sea</i>	SEA	544 pb	Betley; Mekalanos(1985)
SEB1: GAA TGA TAT TAA TTC GCA TC SEB2: TCT TTG TCG TAA GAT AAA CTT C	<i>seb</i>	SEB	416 pb	Jones; Khan (1986)
SEC1: GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT SEC2: AAA TCG GAT TAA CAT TAT CCA	<i>sec</i>	SEC	257 pb	Bohach; Schievert (1987)
SED1: TTA CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT SED2: CCA CCA TAA CAA TTA ATG C	<i>sed</i>	SED	334 pb	Bayles; landolo (1989)
SEE1: ATA GAT AAA GTT AAA ACA AGC AA SEE2: TAA CTT ACC GTG GAC CC	<i>see</i>	SEE	170 pb	Couch <i>et al.</i> (1988)
SEI1: TGG AAC AGG ACA AGC TGA AA SEI2: TAA AGT GGC CCC TCC ATA CA	<i>sei</i>	SEI	467 pb	Munson <i>et al.</i> (1998)
SEJ1: CAG CGA TAG CAA AAA TGA AAC A SEJ2: TCA AGC GGA ACA ACA GTT CTG A	<i>sej</i>	SEJ	426 pb	Zhang <i>et al.</i> (1998)

A amplificação dos genes foi realizada em termociclador Thermo Hybaid (Modelo PxE Thermal Cyler - PxE 20102) utilizando uma mistura de 50µL, contendo 1X de tampão PCR, 1,5mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 20pmol de cada oligonucleotídeo, 2U da enzima Taq polimerase, 100ng de DNA bacteriano completando-se o volume para 50µL com água Mili-Q estéril. As condições de amplificação utilizadas foram um ciclo inicial a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 57°C por 30s e extensão a 72°C por 30s e um ciclo final a 72°C por 10min. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose (1,5%, p/v) corado com

solução de brometo de etídio (0,005%, p/v) e fotografados em foto documentador (Eagle Eye II, Stratagene).

Para cada gene pesquisado foi utilizado um controle positivo e negativo da reação. As cepas *S. aureus* ATCC 13565 (*sea*), *S. aureus* ATCC 14458 (*seb*), *S. aureus* ATCC 19095 (*sec*), *S. aureus* ATCC 23235 (*sed*), *S. aureus* ATCC 27664 (*see*), *S. aureus* 92-2966 (*sei*) e *S. aureus* 92-2221 (*sej*) foram utilizadas como controle positivo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da identificação de cepas *S. aureus* isoladas em uma linha de produção de queijo de coalho, através da técnica PCR para o gene *femA* são apresentados na **Tabela 17 e Figura 6**. Das 23 cepas de *S. aureus* previamente identificadas pelo *API[®] Staph* (BioMérieux), verificou-se amplificação do fragmento específico para o gene *femA* em 19 destas, confirmando a identificação fenotípica em apenas 82,6% (19/23) das cepas analisadas, demonstrando maior especificidade e poder discriminatório da análise genética.

Métodos baseados na PCR têm sido empregados na detecção e identificação de bactérias patogênicas em alimentos (OLSEN *et al.*, 2000; BLAIOTTA *et al.*, 2004). A PCR para o gene *femA*, que é considerado específico e universalmente presente em cepas de *S. aureus*, tem se mostrado promissora na identificação genotípica deste patógeno, tanto em isolados de amostras clínicas (VANNUFFEL *et al.*, 1995) como de alimentos (ARCURI *et al.*, 2004; LANGE *et al.*, 2004; FREITAS, 2005).

Em pesquisa similar realizada com queijo Minas frescal, Freitas (2005) observou a amplificação do gene *femA* em 57 (51,4%) das 111 colônias de *Staphylococcus* coagulase positiva (104) e negativa (7) isoladas do queijo,

confirmando a identificação de *S. aureus*. O fato de 48,6% das colônias não ter apresentado amplificação do referido gene, indicou que não eram *S. aureus*.

Tabela 17. Confirmação da identificação de cepas *S. aureus* isoladas em uma linha de produção de queijo de coalho, através da técnica PCR.

Lote	Amostra	Identificação da espécie	
		API® Staph *	PCR gene <i>femA</i>
I	Leite cru	<i>S. aureus</i>	Positivo
		<i>S. aureus</i>	Positivo
II	Leite cru	<i>S. aureus</i>	Positivo
		<i>S. aureus</i>	Positivo
		<i>S. aureus</i>	Positivo
		<i>S. aureus</i>	Positivo
III	Leite cru	<i>S. aureus</i>	Positivo
		<i>S. aureus</i>	Positivo
		<i>S. aureus</i>	Positivo
		<i>S. aureus</i>	Positivo
	Luva 2	<i>S. aureus</i>	Negativo
		<i>S. aureus</i>	Positivo
IV	Leite cru	<i>S. aureus</i>	Positivo
		<i>S. aureus</i>	Positivo
		<i>S. aureus</i>	Positivo
		<i>S. aureus</i>	Positivo
		<i>S. aureus</i>	Positivo
	Leite cru	<i>S. aureus</i>	Positivo
V	Queijo	<i>S. aureus</i>	Negativo
		<i>S. aureus</i>	Negativo
	Mesa enformagem	<i>S. aureus</i>	Negativo
	Luva 2	<i>S. aureus</i>	Negativo
	Luva 3	<i>S. aureus</i>	Positivo
		<i>S. aureus</i>	Positivo

Identificadas pelo API® Staph (BioMérieux).

Arcuri e outros (2004) constataram a presença do gene *femA* em 56 das 59 cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de leite de tanque de refrigeração de 24 propriedades rurais, situadas na região Sudoeste de Minas Gerais e Norte do Estado de Rio de Janeiro, confirmando a ocorrência de *S.*

aureus no leite de 91,7% (22/24) das propriedades avaliadas. Em outro estudo, Lange e outros (2004) detectaram a presença do gene *femA* em 75,5% (80/106) das cepas *Staphylococcus* produtoras de coagulase isoladas de leite proveniente de tanques de estocagem refrigerado de fazendas leiteiras e, de leite de vacas bovinas e bubalinas com mastite clínica e subclínica, confirmando a viabilidade da PCR do gene *femA* na identificação de *S. aureus*.

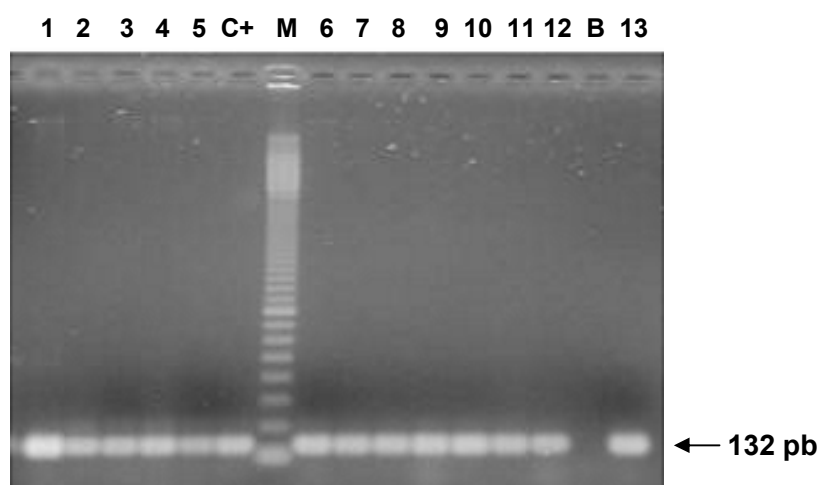


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* femA1 e femA2 para o gene *femA* específico para *S. aureus*. Coluna 1 a 13: isolados positivo; coluna C+: controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923); coluna B: Controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

Os resultados da pesquisa de genes de enterotoxinas estafilocócicas em *Staphylococcus* spp., isolados em uma linha de produção de queijo de coalho podem ser observados na **Tabela 18** e **Figuras 7 e 8**.

Doze (37,5%) das 32 cepas de *Staphylococcus* isoladas de leite cru, coalhada, queijo e da prateleira da câmara de maturação (**Tabela 19**), foram positivas para os genes *sea* ou *sec*, entre os sete genes de enterotoxinas estafilocócicas analisados pela PCR. De acordo com dados disponíveis na literatura, a frequência de genes de enterotoxinas em *Staphylococcus* spp.,

isoladas de produtos lácteos, é bastante variável. O gene *sec* foi detectado em 91,7% das cepas positivas (11/12), incluindo cepas coagulase positiva e negativa, enquanto o gene *sea* foi constatado em apenas uma (8,3%) cepa de *S. xylosus* (**Tabela 18 e Figura 8**). Os genes *seb*, *sed*, *see*, *sei* e *sej* não foram detectados em 100% das cepas pesquisadas. A presença de espécies de *Staphylococcus* com potencial enterotoxigênico na linha de produção do queijo de coalho, principalmente no queijo, pode oferecer risco de causar intoxicação estafilocócica ao consumidor.

Tabela 18. Pesquisa de sete genes de enterotoxinas estafilocócicas em 12 cepas de *Staphylococcus* spp., isoladas em uma linha de produção de queijo de coalho, utilizando a técnica PCR.

Lote	Amostra	Espécie* / Nº cepas	Coagulase	Genes
I	Leite cru	<i>S. aureus</i> (2)	+	<i>sec</i>
	Coalhada	<i>S. xylosus</i> (1)	-	<i>sec</i>
II	Leite cru	<i>S. aureus</i> (1)	+	<i>sec</i>
		<i>S. xylosus</i> (1)	-	<i>sec</i>
	Câmara maturação	<i>S. xylosus</i> (1)	-	<i>sea</i>
III	Leite cru	<i>S. xylosus</i> (1)	-	<i>sec</i>
	Queijo	<i>S. haemolyticus</i> (1)	-	<i>sec</i>
IV	Leite cru	<i>S. hyicus</i> (1)	-	<i>sec</i>
		<i>S. hyicus</i> (2)	+	<i>sec</i>
		<i>S. intermedius</i> (1)	+	<i>sec</i>

* Identificação através do API® Staph (BioMérieux)

Entre as 12 cepas de *Staphylococcus* com potencial enterotoxigênico identificadas na linha de produção de queijo de coalho, 50,0% (6/12) eram constituídas por espécies coagulase positiva tais como *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* e, 50,0% (6/12) por espécies coagulase negativa, como *S. haemolyticus*, *S. hyicus* e *S. xylosus* (**Tabela 18**), indicando alta frequência de cepas com potencial enterotoxigênico não produtoras de coagulase. Esse resultado é preocupante, visto que a legislação vigente estabelece apenas a

contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos. Deste modo, a população de *Staphylococcus* com potencial enterotoxigênicos coagulase negativa, pode estar sendo subestimada em análises de controle de qualidade de alimentos. De acordo com Pereira e Pereira (2005) o ideal seria realizar, também, a detecção da presença de enterotoxinas no alimento para controle de qualidade do mesmo e para elucidação de surtos de intoxicação alimentar.

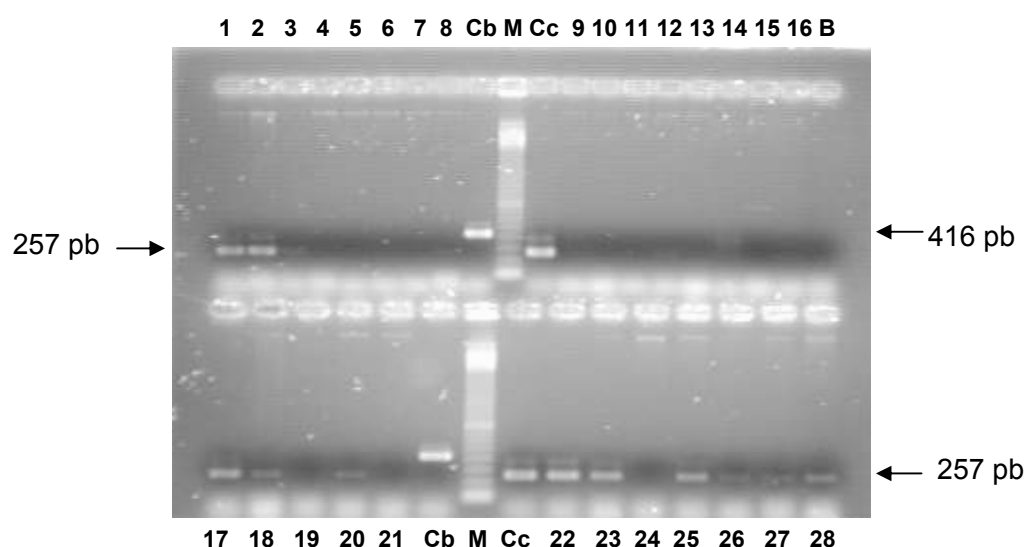


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os *primers* SEB1/ SEB2 e SEC1/ SEC2 para os genes *seb* e *sec* específicos das enterotoxinas estafilocócicas SEB e SEC. Coluna 1, 2, 17, 18, 20, 22, 23, 25, 26, 27 e 28: isolados positivo para o gene *sec*; coluna 3 a 16, 19, 21 e 24: isolados negativos para o gene *sec*; coluna 1 a 28: isolados negativos pra o gene *seb*; coluna Cb: controle positivo gene *seb* (*S. aureus* ATCC 14458); coluna Cc: controle positivo gene *sec* (*S. aureus* ATCC 19095); coluna B: controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (*Amersham*, 100pb).

Em cepas produtoras de coagulase, como *S. aureus* e *S. intermedius*, a detecção de genes de enterotoxinas e a produção de enterotoxinas correspondentes em alimentos, apresentou boa correlação, em vários estudos (NÁJERA-SÁNCHEZ *et al.*, 2003; ADWAN; ABU-SHANAB; ADWAN, 2005).

Similarmente, para cepas não produtoras de coagulase como *S. haemolyticus*, *S. hyicus* (algumas cepas são produtoras de coagulase) e *S. xylosus*, essa relação têm sido comprovada em alguns surtos de intoxicação estafilocócica e, experimentalmente, em alimentos ou em meios de cultivo laboratorial (BAUTISTA *et al.*, 1988; VERNIZY-ROZAND, 1996b; UDO *et al.*, 1999). Oliveira (1999) constatou que cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa *S. chromogenes* e *S. warneri*, possuem capacidade de se desenvolver e produzir enterotoxinas, experimentalmente, em alimentos e, enfatizou a necessidade de uma reavaliação nas metodologias adotadas como rotina em análises de estafilococos enterotoxigênicos em laboratórios de microbiologia de alimentos.

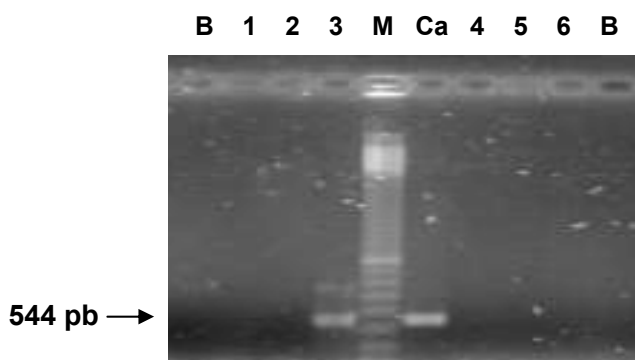


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* SEA1 e SEA2 para o gene *sea* específico da enterotoxina estafilocócica SEA. Coluna 3: isolado positivo para o gene *sea*; coluna 1, 2, 4, 5, e 6: isolados negativos para o gene *sea*; coluna Ca: controle positivo gene *sea* (*S. aureus* ATCC 13565); coluna B: controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

A incidência de genes de enterotoxinas em cepas *Staphylococcus* sp. isoladas de alimentos, apresenta grande variabilidade. Na literatura há relatos que variam de 3,6 (ARCURI *et al.*, 2004) a 100% (NÁJERA-SÁNCHEZ *et al.*, 2003).

Além disso, a presença destes genes não indica, necessariamente, produção e atividade biológica de suas respectivas enterotoxinas.

Os resultados obtidos neste estudo foram similares aos observados por Freitas (2005), que constatou a presença de genes de enterotoxinas estafilocócicas clássicas em 30,6% (34/111) das colônias de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo Minas frescal, analisadas pela Multiplex PCR. Os 34 isolados enterotoxigênicos foram positivos para três genes, sendo 24 isolados positivos para *sea* + *seb*, cinco para *sea*, e cinco para *sed*. A autora, também, observou alta frequência de isolados coagulase positiva (104/111) em relação aos coagulase negativa (7/111), porém a prevalência de *Staphylococcus* sp. com potencial enterotoxigênico foi maior em isolados coagulase negativa (3/7), do que em isolados coagulase positiva (31/104). Por outro lado, Vernozy-Rozand e outros (1996b) verificaram baixa porcentagem, 5,9% (11/187), de *Staphylococcus* enterotoxigênicos entre as 187 cepas de *Staphylococcus* não produtores de coagulase isoladas de leite, soro e queijo de cabra e, entre os cinco genes e enterotoxinas clássicas pesquisadas, apenas a presença do gene *see* e a produção de enterotoxina E foi constatada nos 11 isolados enterotoxigênicos. Rosec e Gigaud (2002) também constataram baixa incidência (9/74) de genes de enterotoxinas em cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa.

Nájera-Sánchez e outros (2003) relataram que 100% (51/51) das cepas de *S. aureus* isoladas de carnes, leite em pó e queijos, continham os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*, sendo a SED o tipo mais frequente de enterotoxina (68%), seguida da SEA (64%), SEC (40%) e SEA + SED (14%). Holecková e outros (2002) também constataram a alta taxa (47,4%) de *S. aureus* enterotoxigênico isolados em queijo de leite de ovelha produzido na Eslováquia, com prevalência de SEB em 36,8% (9/19), seguida de SEA (5,3%) e SEA + SEB (5,3%).

Em leite cru, Adwan, Abu-Shanab e Adwan (2005) verificaram que 37% (37/100) das cepas de *S. aureus* isoladas eram positivas para genes de

enterotoxinas: 10,8% (4/37) foram positivas para *sea*, 54,1% (20/37) para *seb*, 10,8% (4/37) para *sec*, 16,2% (6/37) para *sed* e 8,1% (3/37) para *see*. Em pesquisa semelhante, Arcuri e outros (2004) relataram a ocorrência dos genes *seb* e *sec* em apenas 3,6% das 56 cepas de *S. aureus* isoladas de leite cru refrigerado, indicando baixa incidência (3,6%) de genes de enterotoxinas nas cepas analisadas.

Neste trabalho, os genes das novas enterotoxinas *sei* e *sej* não foram detectados nas cepas de *Staphylococcus* isoladas na linha de produção de queijo de coalho. Todavia, em um dos estudos mais abrangentes sobre a detecção de genes de enterotoxinas em *Staphylococcus* sp. isoladas de alimentos na França, Rosec e Gigaud (2002), verificaram que das 118 cepas isoladas de queijos 59 eram positivas para um ou mais genes dos nove genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej*) estudados. Os genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* foram detectados em 54 cepas, enquanto os genes das enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*) foram constatados em apenas 18 cepas. A inclusão dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* elevou a porcentagem de *S. aureus* com potencial enterotoxigênico de 15 (18/118) para 60% (54/118). Esse resultado revelou alta incidência destes novos genes em *S. aureus* isolados de queijos franceses. Em outro estudo, Loncarevic e outros (2005) detectaram a presença dos genes *seb*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej* em 142 cepas de *S. aureus* isoladas de 24 amostras de queijo, produzido a partir de leite cru e, verificaram a ocorrência dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* em 73,2% (104/142). Em pesquisa semelhante, na Inglaterra, Maclauchlin e outros (2000) também observaram alta incidência dos genes *seg*, *seh* e/ou *sei* em 35% das cepas (45/129) de *S. aureus* isoladas de alimentos, nas quais os genes de enterotoxinas clássicas (*sea* a *see*) não foram detectados.

Omoe e outros (2002) avaliaram distribuição de genes *sea* até *sei* em 146 *S. aureus* isolados de leite cru, alimentos e pessoas envolvidos em casos de intoxicação utilizando Multiplex PCR e, constataram que 77,4% (113/146) das cepas eram positivas para um ou mais dos 11 genes pesquisados. Os autores

também observaram que cepas de *S. aureus* que abrigam o gene *seh* foram capazes de produzir quantidade significativa de SEH (ELISA), enquanto cepas que abrigam os genes *seg* e *sei* não produziram SEG e SEI em quantidade detectáveis, através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

Em um estudo realizado na Inglaterra, Maclauchlin e outros (2000) relataram a amplificação de fragmentos dos genes de enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh* e *sei* em 129 cepas de *S. aureus* isoladas de 32 alimentos suspeitos de envolvimento em casos de intoxicação estafilocócica. A ocorrência dos genes *see*, *seg*, *seh* e *sei* foi constatada em cepas isoladas de 17 alimentos, enquanto os genes *sea* a *sed* foram detectados em cepas isoladas de 15. Os autores ainda, verificaram que 34,9% (45/129) dos isolados analisados abrigavam os genes *seg* ou *seg* + *sei*.

Loncarevic e outros (2005) constataram que a Multiplex PCR elevou a porcentagem de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas de 34,4% para 55,7%, quando comparada com a técnica imunoenzimática SET-RPLA (*Reversed passive latex agglutination*). Esse resultado foi atribuído à baixa sensibilidade da Kit SET-RPLA ou pelo fato de que a detecção de genes de enterotoxinas não indicava necessariamente produção e atividade biológica da toxina. Os autores recomendaram que, em casos em que os sintomas típicos de intoxicação estafilocócica são observados, vários isolados de *S. aureus* devem ser testados e que métodos com habilidade para detectar os novos genes de enterotoxinas, como a Multiplex PCR, devem ser utilizados na investigação.

Vários estudos sobre as enterotoxinas clássicas têm demonstrado boa correlação entre a ocorrência dos genes *sea* a *see* e a síntese das enterotoxinas correspondentes (SEA a SEE). Mas, de acordo com Le Loir, Baron e Gautier (2003) esta correlação ainda não está clara para as enterotoxinas produzidas por genes descritos nos últimos anos. Esse fato deve-se à dificuldade em desenvolver métodos imunoenzimáticos (ELISA) eficientes para a detecção das novas

enterotoxinas estafilocócicas, embora, recentemente, ensaios imunoenzimáticos para a produção de SEG, SEH e SEI tenham sido conduzidos por pesquisadores em laboratório (OMOE *et al.*, 2002; JØRGENSEN *et al.*, 2005). Além disso, outros estudos demonstraram que as enterotoxinas SEG, SEH, SEI e SEJ produzem reação emética em macacos (REN *et al.*, 1994) e a SEH já foi envolvida em casos de intoxicação alimentar (SU; WONG, 1995; PEREIRA *et al.*, 1996; JØRGENSEN *et al.*, 2005).

Considerando que os genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* têm sido constatados com alta frequência em *S. aureus* e outras espécies de *Staphylococcus* isolados de alimentos, acredita-se que surtos e casos esporádicos de intoxicação estafilocócica não elucidados podem ser atribuídos às enterotoxinas SEG, SEH, SEI e SEJ, entre outras.

4. CONCLUSÕES

A amplificação de um fragmento do gene *femA* pela PCR mostrou-se uma ferramenta útil para identificação molecular de *S. aureus*.

A técnica Multiplex PCR mostrou-se eficiente na avaliação do potencial enterotoxigênico de cepas *Staphylococcus* isoladas de alimentos.

A alta frequência de cepas não produtoras de coagulase, com potencial enterotoxigênico, detectada na linha de produção de queijo de coalho, indica a necessidade de uma reavaliação dos padrões microbiológicos, estabelecidos pela Legislação Brasileira, para *Staphylococcus* enterotoxigênico em alimentos, que até o momento, correlacionam à produção da enzima coagulase com a capacidade de produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* spp.

A ocorrência de cepas de *Staphylococcus* com potencial enterotoxigênico, incluindo espécies produtoras ou não produtoras de coagulase, na linha de

produção de queijo de coalho, representa um risco de causar intoxicação alimentar estafilocócica aos consumidores.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo 502929/2003-0) pelo suporte financeiro. À Embrapa Agroindústria Tropical e à Embrapa Gado de Leite pelo apoio técnico durante a execução da pesquisa. À Fundação Oswaldo Cruz / INCQS, em especial ao Dr. Ivano de Filippis e ao Dr. Jean Philippe Rosec (Laboratoire Interrégional de la DGCCRF, France) pela doação das cepas padrões de *Staphylococcus enterotoxigênico*. Ao LABEX França, em especial a Dra. Regina Lago e à Embrapa Meio Ambiente por terem viabilizado a importação de cepas padrões.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, J.; ITO, Y.; ONIMARU, M.; KOHSAKA, T.; TAKEDA, T. Characterization and distribution of a new enterotoxin-related superantigen produced by *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 44, n. 2, p. 79-88, Feb., 2000.

ADESIYUN, A. A.; TATINI, S. R.; HOOVER, D. G. Productions of enterotoxins by *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, Shannon, v. 9, n. 5, p. 487-495, Sept., 1984.

ADWAN, G.; ABU-SHANAB, B.; ADWAN, K. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk in the North of Palestine. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 29, n. 4, p. 229-232, Out./Dec., 2005.

ARCURI, E. F.; OLIVEIRA, R. C.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C.; BRITO, M. A. Avaliação do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru refrigerado pela detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec*, e *sed* através da PCR.

In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo. **Anais**. Passo Fundo: Universidade Federal de Passo Fundo, 2004. p. 1-3.

BABA, T.; TAKEUCHI, F.; KURODA, M.; YUZAWA, H.; AOKI, K.; OGUCHI, A.; NAGAI, Y.; IWAMA, N.; ASANO, K.; NAIMI, T.; KURODA, H.; CUI, L.; YAMAMOTO, K.; HIRAMATSU, K. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. **The Lancet**, London, v. 359, n. 9320, p. 1819-1827, May, 2002.

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

BAUTISTA, L.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk *Staphylococci*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 2, p. 566-569, Feb., 1988.

BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, n. 9, p. 4799-4806, Sept., 1989.

BECKER, K.; KELLER, B.; VON EIFF, C.; BRUCK, M.; LUBRITZ, G.; ETIENNE, J.; PETERS, G. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 12, p. 5551-5557, Dec., 2001.

BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two Multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, and Toxic Shock Syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 9, p. 2548-2553, Sept., 1998.

BENSON, T. E.; PRINCE, D. B.; MUTCHLER, V. T.; CURRY, K. A.; HO, A. M.; SARVER, R. W.; HAGADORN, J. C.; CHOI, G. H.; GARLICK, R. L. X-ray crystal

structure of *Staphylococcus aureus* FemA. **Structure**, London, v. 10, n. 8, p. 1107-1115, Aug., 2002.

BETLEY, M. J.; BORST, D. W.; REGASSA, L. B. Staphylococcal enterotoxin, Toxic Shock Syndrome and staphylococcal pyrogenic enterotoxins: a comparative study of their molecular biology. **Chemical and Immunology**, v. 55, n.1, p. 1-35, Jan., 1992.

BETLEY, M. J.; MEKALANOS, J. J. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. **Science**, Washington, v. 229, n. 4729, p. 185-187, July, 1985.

BLAIOTTA, G.; ERCOLINE, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. Strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of *seG* and *seL* in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 97, n. 5, p. 719-730, May, 2004.

BOHACH, G. A.; SCHIEVERT, P. M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C₁ gene and relatedness to other pyrogenic toxins. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 209, n. 1, p. 15-20, Aug., 1987.

BRECKINRIDGE, J. C.; BERGDOLL, M. S. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin producing *Staphylococcus*. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 284, n. 10, p. 541-543, Oct., 1971.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, London, v.19, n. 1, p. 9-14, Jan./Feb., 2002.

CHAPAVAL, L. **Detecção de enterotoxinas estafilocócicas produzidas por *Staphylococcus aureus* no leite bovino por eletroforese capilar e identificação dos isolados enterotoxigênicos via PCR.** 2003. 140p. Tese

(Doutor em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CHENG-CHUN, C.; LI-FEN, C. Enterotoxin production by *Staphylococcus warneri* CCRC 12929, a coagulase-negative strain. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 8, p. 923–927, Aug., 1997.

COUCH, J. L.; SOLTIS, M. T.; BETLEY, M. J. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 7, p. 2954–2960 July, 1988.

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

DE LUCA, G.; ZANETTI, F.; STAMPI, S. *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 267-270, Apr., 1997.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Minneapolis, v. 13, n.1, p. 16-34, Jan., 2000.

EVERSON, M. L.; HINDS, M. W; BERNSTEIN, R. S.; BERGDOLL, M. S. Estimation of human dose staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 7, n. 4, p. 311-316, Dec., 1988.

FREITAS, E. I. **Detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus* sp. isolados de queijo Minas Frescal**. 2005. 106p. Dissertação (Mestre em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

FITZGERALD, J. R.; MONDAY, S. R.; FOSTER, T. J.; BOHACH, G. A.; HARTIGAN, P.J.; MEANEY, W.J.; SMYTH, C. J. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 1, p. 63-70, Jan., 2001.

HESSELBARTH, J.; SCHWARZ, S. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dog, pigeons, horses and mink. **Veterinary Microbiology**, Utrecht, v. 45, n. 1, p. 11-17, Jan., 1995.

HIROOKA E. Y.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C.; VICENTE, E.; YOSHIMOTO, Y.; BERGDOLL, M. S. Enterotoxigenicity *Staphylococcus intermedius* of canine origin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 185-191, Jan., 1988.

HOLECKOVÁ, B.; HOLODA, E.; FOTTA, V.; KALINÁCOVÁ, V.; GONDOL, J.; GROLMUS, J. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Dublin, v. 9, n. 3, p. 179-182, Mar., 2002.

IKEDA, T.; TOMATE, N.; YAMAGUCHI, K.; MAKINO, S. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of Staphylococcal enterotoxins A and H. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 5, p. 2793-2795, May, 2005.

JABLONSKI, L. M.; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. 2nd ed., Washington D. C.: ASM, 2001. Chap. 19, p. 411-434.

JARRAUD, S.; COZON, G; VANDERNESCH, F.; BES, M.; ETIENNE, J.; LINA, G. Involvement of enterotoxin G and I in staphylococcal Toxic Shock Syndrome and

staphylococcal scarlat fever. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington v. 37, n. 8, p. 2446-2449, Aug., 1999.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *cgc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 166, n.1, p. 669-677, Jan., 2001.

JONES, C. L.; KHAN, S. A. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 166, n. 1, p. 20-33, Apr., 1986.

JØRGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LØVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 252, n. 2, p. 267-272, Nov., 2005.

KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYSHI, I.; CUI, L.; OGUCHI, A.; AOKI, K.; NAGAI, Y.; LIAN, J.; ITO, T.; KANAMORI, M.; MATSUMARU, H.; MARUYAMA, A.; MURAKAMI, H.; HOSOYAMA, A.; MIZUTANI-UI, Y.; TAKAHASHI, N. K.; SAWANO, T.; INOUE, R.; KAITO, C.; SEKIMIZU, K.; HIRAKAWA, H.; KUHARA, S.; GOTO, S.; YABUZAKI, J.; KANEHISA, M.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; FURUYA, K.; YOSHINA, C.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; OGASAWARA, N.; HAYSHI, H.; HIRAMATSU, K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, London, v. 357, n. 9264, p. 1225-1240, Apr., 2001.

LANGE, C.; BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F.; BRITO, J. R. F.; TAVARES, W.; CARVALHO, L. B.; MARICATO, E. Identificação de *Staphylococcus coagulase*-positivos isolados de leite cru pela técnica de PCR. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo. **Anais**. Passo Fundo: Universidade Federal de Passo Fundo, 2004. p. 1-4.

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

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 95, n. 1, p. 38-43, Jan., 2003.

LONCAREVIC, S.; JORGENSEN, H. J.; LOVSETH, A.; MATHISEN, T.; ROVIK, L. M. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 98, n. 3, p. 344-350, Mar., 2005.

MARR, J. C.; LYON, J. D.; ROBERSON, J. R.; LUPHER, M.; DAVIS, W. C.; BOHACH, G. A. Characterization of a novel type C staphylococcal enterotoxins: biological end evolutionary implications. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, n. 10, p. 4254-4262, Oct., 1993.

MARTIN, S. E.; MYERS, E.R.; LANDOLO, J. J. *Staphylococcus aureus*. In: HUI, Y.H.; PIERSON, M.D.; GORHAM, J.R. (Eds.). **Foodborn disease handbook – bacterial pathogens**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2001. v. 1. Chap. 15. p. 345-381.

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

MEYRAND, A.; VERNOSY-ROZAND, C. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in different cheeses. **Revue Medicine Veterinaire**, Paris, v. 150, n. 7, p. 601-616, July, 1999.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W.M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, Mar., 2000.

MONDAY, S. R.; BOHACH, G. A. Use of Multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal Isolates **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 10, p. 3411-3414, Oct., 1999.

MUNSON, S. H.; TREMAINE, M. T. ; BETLEY, M. J.; WELCH, R. A. Identification and characterization staphylococcal enterotoxins of type G and from *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 7, p. 3337-3348, July, 1998.

NÁJERA-SÁNCHEZ, G.; MALDONADO-RODRÍGUEZ, R.; OLVERA, P. R.; GARZA, L. M. Development of two Multiplex Polymerase Chain Reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from food. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 6, p. 1055–1062, June, 2003.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASLELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BALZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N. C.; CELANO, G. V. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 73-79, Jan., 2005.

OLIVEIRA, A. M. **Investigação do comportamento de estafilococos enterotoxigênicos coagulase negativos, em alimentos**. 1999. 102p. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) – Departamento de Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

OLSEN, S. J.; MACKINON, L. C.; GOULGING, J. S.; SLUTSKER, L. Surveillance for foodborne disease outbreaks, 1992-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, n. SS01, p. 1-51, Mar., 2000.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 246, n. 2, p. 191-198, May, 2005.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin- related putative toxin encoded by to kinds of plasmids. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 6, p. 6088--6094, June, 2003.

OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; YU, S.; HU, D.L.; UEDA, S.; SHINAGAWA, K. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productive of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 3, p. 857-862, Mar., 2002.

OMORI, G.; KATO, Y. A staphylococcal food-poisoning caused by a coagulase-negative strain. **Biken's Journal**, Berlin, v. 2, p. 92- 92, Jan., 1959.

ORWIN, P. M.; FITZGERALD, J. R.; LEUNG, D. Y. M.; GUTERREZ, J. A.; BOACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 2, p. 2916--2919, Feb., 2003.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D. Y. M.; DONAHUE, H. I.; NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P. M. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K.

Infection and Immunity, Washington, v. 69, n. 3, p. 360-366, Mar., 2001.

PEREIRA, M. L.; CARMO, J. S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de *Staphylococcus* coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas, em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 171-175, maio/ago., 2001.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; SANTOS, E. J.; PEREIRA, J. L.; BERGDOLL, M. S. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n. 5, p. 559-561, May, 1996.

PEREIRA, K. S.; PEREIRA, J. L. Estafilococos coagulase negativa: potenciais patógenos em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 129, p. 32-34, mar., 2005.

REN, K.; BANNAN, J. D.; PANCHOLI, V.; CHEUNG, A. L.; ROBBINS, J. C.; FISCHETTI, V. A.; ZABRISKIE, J. B. Characterization and biological properties of a new staphylococcal enterotoxin, **The Journal Experimental of Medicine**, New York, v. 180, n. 5 , p. 1675-1683, Nov., 1994.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 77, n. 1/2, p. 61-70, Jan./Feb. 2002.

ROSEC, J. P.; GUIRAUD, J. P.; DALET, C.; RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 213-221, Mar. 1997.

SHARMA, N. K.; REES, C. E. D.; DODD, C.R. Development of a single-reaction Multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, p. 1347-1353, Apr., 2000.

SORIANO, J. M.; FRONT, G.; RICO, H.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Incidence of enterotoxigenic *Staphylococci* and their toxins in foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 5, p. 857-860, May, 2002.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p.1438-1443, Apr., 1995.

UDO, E. E.; AL-BUSTAN, M. A.; JACOB, L. E.; CHUGH, T. D. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait city may be a potential cause of food poisoning. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 48, n. 9, p. 819-823, Sept., 1999.

VANNUFFEL, P.; GIGI, J.; EZZEDINE, H.; VANDERCAM, B.; DELMEE, M.; WAUTERS, G.; GALA, J. L. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 11, p. 2864-2867, Nov., 1995.

VANNUFFEL, P.; HEUSTERSPREUTE, M.; BOUYER, M.; VANDERCAM, B.; PHILIPPE, M; GALA J. L. Molecular characterization of *femA* from *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and *femA*-based discrimination of staphylococcal species. **Research Microbiology**, Paris, v. 150, n. 2, p. 129-141, Mar., 1999.

VANNUFFEL, P.; LATERRE, P. F.; BOUYER, M.; GIGI, J.; VANDERCAM, B.; REYNAERT, M.; GALA, J. L. Rapid and specific molecular identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in endotracheal aspirates from

mechanically ventilated Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 8, p. 2366-2368, Aug., 1998.

VERAS, J. F.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; FERNANDES, T. M. G.; AZALIM, C.C.; SILVA, M. C. C.; MARTNS, R. T.; CERQUEIRA, M. M.O.P. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n. 104/105, p. 218-119, jan./fev., 2003.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PERRIN, G.; HAOND, F.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Identification *Micrococcaceae* isolated from goat's milk and cheese in the Poitou-Charentes region. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 373-378, Mar., 1996a.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococcal isolated from goats and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 271-280, Mar., 1996b.

YARWOOD, J. M.; MCCORMICK, J. K.; PAUSTIAN, M. L.; ORWIN, P. M.; KAPUR, V.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization and Expression Analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity Island 3: implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. **Journal Biological Chemistry**, v. 277, n. 15, p. 13138-13147, Apr., 2002.

ZHANG, S.; IANDOLO, J. J.; STEWART, G. C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 168, n. 2, p. 227 -233, Nov., 1998