



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

**Queijo de coalho do sertão Alagoano:
Enterotoxigenicidade de *S. aureus* pela reacção em
cadeia da polimerase (PCR)**

Ângela Isabel Espinha da Fonte

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar – Biotecnologia Microbiana

Orientador: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito

Co-orientador: Maria Cristina Delgado

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;
Doutora Elsa Maria da Conceição Agostinho Neves, Professora Auxiliar do Instituto PIAGET.

Lisboa, 2012

No presente trabalho incluem-se os resultados da seguinte publicação:

Moraes, J.O., Fonte, A.I.E., Silva, M. C.D., Pinto, M.F.P.G., (2011). Avaliação da enterotoxigenicidade em *Staphylococcus* sp. coagulase positiva isolados de queijo de coalho produzido em alagoas. Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos. Unicamp, Campinas, São Paulo-Brasil.

Agradecimentos

O desenvolvimento deste trabalho de investigação foi dificultado por vários factores. No entanto, o apoio de algumas pessoas facilitou, de algum modo, a elaboração desta dissertação. Apesar de se tornar difícil agradecer a todas as pessoas que me apoiaram, de uma forma ou de outra, gostaria no entanto de deixar aqui registados alguns agradecimentos.

Assim, começo por agradecer à Prof^a. Doutora Luísa Brito, minha orientadora, por me ter aceitado como sua orientanda, pelo apoio, dedicação e motivação ao longo destes sete meses. Agradeço-lhe ainda, o facto de se ter disponibilizado em todo e qualquer momento e pelas suas sugestões que sempre evidenciaram para me auxiliar e aconselhar.

Agradeço à Prof^a Doutora Maria Cristina Delgado pela orientação, companheirismo e simpatia com que me recebeu no laboratório. Agradeço-lhe ainda por ter disponibilizado todos os recursos, que tinha em sua posse, para elaboração da minha pesquisa.

Um especial agradecimento a toda equipa do Laboratório de Controlo e Qualidade dos Alimentos/UFAL-Maceió-Brasil. À minha colega Juliana Moraes pelo carinho, amizade e partilha de conhecimento e ao pessoal do laboratório (Malú, Sheila, Wanessa, Cantídio, Camila) pela boa disposição e partilha de grandes momentos. Agradeço também minha colega e amiga Marta Pinto por me ter acompanhado nesta aventura, e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Aos meus primos, tios e amigos por me acompanharem desde sempre, pelo aconchego e confiança transmitida.

Por fim, aos meus pais, mano e Ziza, que sempre me apoiaram incondicionalmente em todas decisões que tomei na minha vida, a palavra “Obrigado”, nunca será suficiente.

Muito obrigado a todos!

Resumo

As enterotoxinas estafilocócicas são toxinas eméticas, e são uma das principais causas de intoxicações alimentares em humanos. Sabe-se que 95% das intoxicações alimentares estafilocócicas são causadas pelas enterotoxinas clássicas (SEA a SEE).

Este estudo centrou-se na determinação da incidência de genes enterotoxigênicos (*sea* a *see*) em 40 isolados de *Staphylococcus aureus* de sete amostras de queijo de coalho do sertão Alagoano através da técnica PCR. Todos os isolados de *S.aureus* foram positivos para um ou mais genes, sendo os genótipos mais observados, *sea* (32,5%), *seb* (22,5%), *sec* (42,5%), *sed* (25%), *see* (42,5%) e associações de *sea* + *sec* (15%) e *sec* + *see* (30%).

No decorrer do trabalho, determinou-se ainda a ocorrência de *S. aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria* e de coliformes totais e fecais, em sete amostras de queijo de coalho do sertão Alagoano. Todas as amostras continham contagens de estafilococos superiores a 10^4 UFC/g e três das amostras (42,9%) apresentaram *Salmonella* spp.. Quanto à contaminação por coliformes totais, todas as amostras apresentaram valores superiores ao admitido por lei e 57,1% das amostras apresentavam coliformes fecais. Estes valores são alarmantes, constatando-se que a maioria das amostras não atenderam à legislação Brasileira para queijo de coalho encontrando-se impróprias para consumo.

Palavras-chave: Queijo de coalho do sertão Alagoano, intoxicações alimentares, *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas estafilocócicas, PCR

Abstract

Staphylococcal enterotoxins (SE) are emetic toxins and are one of the main causes of food poisoning in humans. It is known that about 95% of staphylococcal food poisoning outbreaks are caused by SE types SEA to SEE. In this study, to investigate the distribution of staphylococcal enterotoxin genes (*sea* to *see*) in *Staphylococcus aureus*, 40 isolates obtained in Alagoas-Brazil from “coalho” cheese were analyzed by PCR. All *S. aureus* isolates were found to be positive for one or more *se* genes. Among the 40 isolates of *S. aureus* positive by PCR, the genotypes found were *sea* (32.5%), *seb*(22.5%), *sec* (42.5%), *sed* (25%), *see* (42.5%) and associations *sea*+*sec* (15%) and *sec*+*see* (30%).

During this work, in seven samples of “coalho” cheese, obtained from four different industrial brands of sertão Alagoano the occurrence of *S. aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria* and microorganisms indicators of fecal contamination was also determined. All of the samples were positive to coagulase positive staphylococci, and three samples (42.9%) were positive for *Salmonella* spp.. Regarding the contamination by total coliforms, all samples showed values above the limits established in the Brazilian legislation and 57.1% presented fecal coliforms. Such values are alarming since the majority of the analyzed products were inappropriate for consumption.

Keywords: “Coalho” cheese from sertão Alagoano, food-poisoning, *Staphylococcus aureus*, Staphylococcal enterotoxins, PCR.

Extended Abstract

“Coalho” cheese is a very nutritious food and its production constitutes a significant fraction of the Northeast region's economy, mainly in the states of Alagoas, Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte and Pernambuco. This type of cheese represents a significant part of the income of milk producers. While the Brazilian legislation establishes that the milk used in the manufacture of these cheeses should be pasteurized or submitted to any other equivalent heat treatment, in most cases this does not happen.

Staphylococcus aureus are pathogenic bacteria, ubiquitous in the environment, subsisting on air, water, sewage, dust, humans and animals. Milk and dairy products are considered common vehicles of this microorganism, since its high protein content is an excellent substrate for microbial growth. Among dairy products, cheese is often considered a carrier of foodborne pathogens, especially fresh artisan cheeses. Microbial contamination of these products by this pathogen is detrimental to both the industry (leading to economic losses) and the Public Health, since some strains of *S. aureus* can produce one or more types of enterotoxins which, after ingestion, may cause staphylococcal intoxication.

The staphylococcal enterotoxins are extracellular proteins, hydrosoluble, resistant to the action of proteolytic enzymes in the gastrointestinal tract and heat-stable, and therefore resistant to pasteurization. So far, 20 types of enterotoxins have been identified, which are serologically distinct, including classical types SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED and SEE and the novel enterotoxins SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER and SEU, whose corresponding genes are described in the literature.

The detection of staphylococcal enterotoxins by immunological methods such as agglutination and ELISA is not always advantageous, since these methods are sluggish, not always detects low concentrations of toxins and kits/antisera are only available to SEA, SEB, SEC and SED.

The technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) has proved to be a rapid, sensitive and specific alternative in the identification of pathogens and genes encoding enterotoxins. The identification of *S. aureus* by PCR is based on the amplification of target virulence genes. Several multiplex PCR methods, that amplify simultaneously more than one gene in the same reaction, have been described in the literature for detection of enterotoxigenic *S.*

aureus in milk and cheese. However, the reproducibility is reduced, requiring that each laboratory standardizes the reactions, according to the gene under study.

Staphylococcal enterotoxins (SE) are emetic toxins and are one of the main causes of food poisoning in humans. It is known that about 95% of staphylococcal food poisoning outbreaks are caused by SE types SEA to SEE. In this study, to investigate the distribution of staphylococcal enterotoxin genes (*sea* to *see*) in *S. aureus*, 40 isolates obtained in Alagoas-Brazil from “coalho” cheese were analyzed by PCR. All *S. aureus* isolates were found to be positive for one or more *se* genes. Among the 40 isolates of *S. aureus* positive by PCR, the genotypes found were *sea* (32.5%), *seb*(22.5%), *sec* (42.5%), *sed* (25%), *see* (42.5%) and associations *sea+sec* (15%) and *sec+see* (30%). The present study also establishes relationship between the presence of these genes and the morphology of the colonies and source of contamination.

During this work, in seven samples of “coalho” cheese, obtained from four different industrial brands of sertão Alagoano the occurrence of *S. aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria* and microorganisms indicators of fecal contamination was also determined. All of the samples were positive to coagulase positive staphylococci, and three samples (42.9%) were positive for *Salmonella* spp.. Regarding the contamination by total coliforms, all samples showed values above the limits established in the Brazilian legislation and 57.1% presented fecal coliforms. Such values are alarming since the majority of the analyzed products were inappropriate for consumption.

Keywords: “Coalho” cheese from sertão Alagoano, food-poisoning, *Staphylococcus aureus*, Staphylococcal enterotoxins, PCR

Abreviaturas

AL	Alagoas
AOAC	Association of Analytical Communities
APT	Água Peptonada Tamponada
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
a_w	Actividade da Água
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BPLS	Ágar Bismuto Sulfito
CPLA	Cooperação de Produção Leiteira de Alagoas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DTA's	Doenças Transmitidas por Alimentos
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GC	Guanina + Citosina
H₂S	Sulfureto de Hidrogénio
kDa	Kilodalton
LIA	Agar Lisina Ferro
LST	Caldo Lauril Sulfato Triptose
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NMP	Número Mais Provável
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de base
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PT	<i>Pyrogenic Toxin</i>
Se	Gene para enterotoxinas estafilocócicas
sea-see	Gene para enterotoxinas estafilocócicas A-E
seg-ser	Gene para enterotoxinas estafilocócicas G-R
seu-sev	Gene para enterotoxinas estafilocócicas U-V
Ses	<i>Staphylococcal Enterotoxins</i>
SEA-SEF	<i>Staphylococcal Enterotoxins A-F</i>
SEG-SER	<i>Staphylococcal Enterotoxins G-R</i>

SEU-SEV	<i>Staphylococcal Enterotoxins U-V</i>
SIM	Sulfureto, Indol, Mobilidade
TE	Tris-EDTA
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i>
tst	Gene que codifica <i>Toxic Shock Syndrome Toxin-1</i>
TSST-1	<i>Toxic Shock Syndrome Toxin-1</i>
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultra Violeta
VM-VP	Vermelho de Metilo e Voges-Proskauer
WHO	<i>World Health Organization</i>
XLD	<i>Xylose lysine deoxycholate</i>

Índice

Índice	i
Lista de Quadros.....	iii
Lista de Ilustrações	IV
Lista de Anexos	V
1. Introdução Geral	1
1.1. Queijo de coalho.....	1
1.2. Doenças transmitidas por alimentos	2
1.3. Intoxicação Alimentar Estafilocócica	4
1.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
1.5. Factores de Patogenicidade de <i>Staphylococcus aureus</i>	9
1.6. Enterotoxinas Estafilocócicas e genes codificadores	10
1.7. Factores que afectam o crescimento, sobrevivência de <i>S. aureus</i> e a produção e destruição de enterotoxinas estafilocócicas.....	14
1.8. Técnicas moleculares na pesquisa de Enterotoxinas Estafilocócicas	16
1.9. Reacção em cadeia pela Polimerase (PCR)	17
1.10. Enquadramento do trabalho e objectivos	19
2. Materiais e Métodos.....	20
2.1. Obtenção e colheita de amostras	20
2.2. Avaliação Microbiológica do Queijo de coalho	20
2.2.1. Enumeração de Coliformes Totais e Fecais.....	20
2.2.2. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	22
2.2.2.1. Cultura, isolamento e selecção	22
2.2.2.2. Testes Preliminares	23
2.2.3. Pesquisa de <i>Listeria</i>	26
2.2.3.1. Cultura, Isolamento e Selecção.....	26
2.2.4. Enumeração de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva.....	29
2.3. Pesquisa e Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	30
2.3.1. Prova da catalase	30
2.3.2. Prova da coagulase	31
2.4. Extracção de DNA Genómico	32
2.5. Detecção dos Genes Enterotoxigénicos por PCR	32
2.5.1. Primers	32
2.5.2. Mistura de amplificação	33
2.5.3. Controlos.....	34

2.5.4.	Condições do Termociclador	34
2.5.5.	Electroforese em gel de Agarose	35
2.5.6.	Aquisição da imagem do gel	35
3.	Resultados e Discussão	36
3.1.	Avaliação Microbiológica de amostras de queijo de coalho	36
3.2.	Detecção dos Genes Enteroroxigenicos por PCR	40
4.	Conclusões	48
5.	Bibliografia	50
6.	Cibergrafia	60
7.	Anexos	61

Lista de Quadros

Quadro 1: Percentagens de intoxicações estafilocócicas em produtos lácteos em vários países da Europa.	6
Quadro 2: Relatos de surtos de Intoxicação estafilocócica relativos ao consumo de produtos lácteos entre 1993 e 2002 no Brasil.	7
Quadro 3: Tipos de Enterotoxinas Estafilocócicas (SE) e genes codificadores.	11
Quadro 4: Características físicas e químicas das enterotoxinas clássicas SEA-SEE..	12
Quadro 5: Limites do crescimento bacteriano e da produção de enterotoxinas.....	15
Quadro 6: Principais características dos diferentes métodos de detecção de enterotoxinas	17
Quadro 7: Meios de cultura e características das colónias típicas de <i>Salmonella</i> spp.	23
Quadro 8: <i>Primers</i> utilizados na detecção de genes toxigénicos por PCR.	33
Quadro 9: Composição da mistura de amplificação	33
Quadro 10: Estirpes de referência e respectivos genes codificadores	34
Quadro 11: Avaliação microbiológica das sete amostras queijo de coalho do sertão Alagoano	37
Quadro 12: Avaliação microbiológica de queijo de coalho do sertão Alagoano	37
Quadro 13: Especificidade dos controlos positivos com os <i>Primers</i>	41
Quadro 14: Genótipos obtidos para as sete amostras em estudo.	44
Quadro 16: Resultados obtidos na enumeração de Coliformes totais e fecais.	64
Quadro 17: Características das colónias de <i>Salmonella</i> spp.	65
Quadro 18: Resultados relativos aos testes preliminares e aos testes bioquímicos envolvidos na pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	66
Quadro 19: Resultados dos testes bioquímicos.	67
Quadro 20: Resultados das contagens de <i>S. aureus</i> nas várias diluições	68
Quadro 21: Resultados referentes aos testes da catalase e da coagulase	68

Lista de Figuras

Figura 1: Patogénios implicados em surtos de DTAs na Europa no período entre 1993 e 1998.....	3
Figura 2: Percentagem de doenças transmitidas por alimentos e intoxicações alimentares estafilocócicas em diferentes países da Europa.	3
Figura 3: Esquematização da enumeração de coliformes totais e fecais	21
Figura 4: Esquematização das análises de pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	22
Figura 5: Esquematização das diferentes etapas de pesquisa de <i>Listeria</i>	27
Figura 6: A) Caldo de Fraser turvo; B) colónias pretas rodeadas por halo escuro em ágar Oxford; C) colónias verde-acinzentadas, em ágar Palcam.....	27
Figura 7: A) Colónias típicas de <i>S.aureus</i> ; B) Isolados de <i>S.aureus</i> em meio TSA	30
Figura 8: A) Prova da catalase; B) Prova da Coagulase	30
Figura 9: Esquematização da metodologia de enumeração de <i>S. aureus</i>	31
Figura 10: Programa do termociclador utilizado na PCR para detecção de genes enterotoxigénicos.....	34
Figura 11: Incidência de genes clássicos isolados, ou combinados.	42
Figura 12: Resultados obtidos em diferentes PCR.....	42
Figura 13: Relação entre a morfologia e a presença de um ou vários genes.	45
Figura 14: Génotipos obtidos nas diferentes amostras em estudo.	45

Lista de Anexos

Anexo 1: Fluxograma do processamento de queijo de coalho.	61
Anexo 2: Preparação do Marcador	62
Anexo 3: Soluções e Tampões	63
Anexo 4: Enumeração de Coliformes totais e fecais	64
Anexo 5: Resultados obtidos na pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	65
Anexo 6: Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	67
Anexo 7: Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	68
Anexo 8: Características das colónias e genes codificadores de enterotoxinas presentes nos isolados.	69

1. Introdução Geral

1.1. Queijo de coalho

De entre os produtos derivados do leite, o queijo é considerado um vector frequente de patogénios de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais por serem, na sua maioria, confeccionados a partir de leite cru e não sofrerem processo de maturação. A contaminação microbiana destes produtos é prejudicial tanto para a indústria, pelas perdas económicas, como para a Saúde Pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (Feitosa *et al.*, 2003).

Entende-se por queijo de coalho, todo o queijo obtido pela coagulação do leite por meio de coalho, complementada ou não pela acção de bactérias lácticas seleccionadas. Este queijo é qualificado como um queijo de média a alta humidade (Anónimo, 1996). No Anexo 1 são evidenciadas todas as etapas do seu processamento. A função do coalho é coagular a caseína presente no leite através da acção de uma enzima fosfoproteolítica, a renina, presente no estômago de jovens ruminantes. A renina actua na hidrólise das ligações peptídicas da caseína, transformando-a em para-caseína que precipita na presença de iões Ca^{2+} formando a coalhada. Este processo depende de factores como a temperatura, o pH e o teor de cálcio do leite. A temperatura óptima de acção do coalho é de 40 °C, mas por norma utilizam-se temperaturas ligeiramente mais baixas (em torno de 35 °C) para evitar que a coalhada fique muito dura.

O queijo de coalho é um alimento muito nutritivo e a sua produção, constitui uma fracção relevante na economia da região do Nordeste, principalmente, nos estados de Alagoas, Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte e Pernambuco, sendo significativo nos rendimentos dos produtores de leite. Embora a legislação Brasileira estabeleça que o leite utilizado na fabricação destes queijos deva ser submetido à pasteurização ou a tratamento térmico equivalente, na maioria dos casos isso não acontece.

No Nordeste do Brasil a maior parte da produção de queijo de coalho é obtida em pequenas e médias queijarias que não apresentam boas práticas de fabrico, não apresentando segurança microbiológica nem padronização da qualidade dos produtos (Feitosa *et al.*, 2003).

Vários estudos sobre a qualidade microbiológica de queijo de coalho relataram ocorrência de microrganismos patogênicos em números que excedem, por vezes, os limites estabelecidos pela legislação (Anônimo, 1996). Dentre as bactérias patogênicas detectadas, destacam-se, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (Paiva *et al.*, 1999; Nassu *et al.*, 2000).

Num estudo realizado em Recife por Luz (2008), a contaminação por *S. aureus* do queijo de coalho, produzido nos vários estados do Nordeste, variou entre 10^3 e 10^6 UFC/g. Estes valores são alarmantes, uma vez que estão acima dos limites estabelecidos pelos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e da Saúde, cujo valor máximo permitido é 10^3 UFC/g (Anônimo, 1996; Anônimo, 2001). Concentrações superiores a 10^5 UFC/g favorecem a produção de enterotoxinas estafilocócicas (Forsythe, 2000) pondo em risco a saúde do consumidor.

1.2. Doenças transmitidas por alimentos

Surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) ocorrem diariamente em todos os países, desde os mais aos menos desenvolvidos. Como a maioria destes surtos não são relatados, a verdadeira dimensão do problema é desconhecida, e os esforços para garantir os recursos e apoios necessários para a identificação e implementação de soluções eficazes muitas vezes falham.

As doenças transmitidas por alimentos são causadas por agentes que penetram no organismo humano, através da ingestão de água ou alimentos contaminados. Estes agentes podem ser químicos, como pesticidas e metais tóxicos, ou biológicos, como microrganismos patogênicos. Existem mais de 250 DTAs identificadas, contudo as bactérias, pela sua diversidade e patogenia, constituem, de longe, o grupo mais importante e usual. Entre as bactérias que causam intoxicações alimentares, algumas são particularmente importantes devido à frequência e/ou gravidade da doença. Diversas bactérias (incluindo Gram positivas e Gram negativas) produzem toxinas que causam as DTAs, resultando em sintomas que vão desde distúrbios gastrointestinais à paralisia e morte (WHO, 2000). Mais de 31 patógenos estão implicados, podendo se destacar *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Camphylobacter* sp., *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus* como principais agentes etiológicos. Na figura 1 estão representadas as percentagens dos principais patógenos envolvidos em surtos

de DTAs na Europa. Os dados são referentes a um estudo realizado no período entre 1993 e 1998 (WHO, 2000).

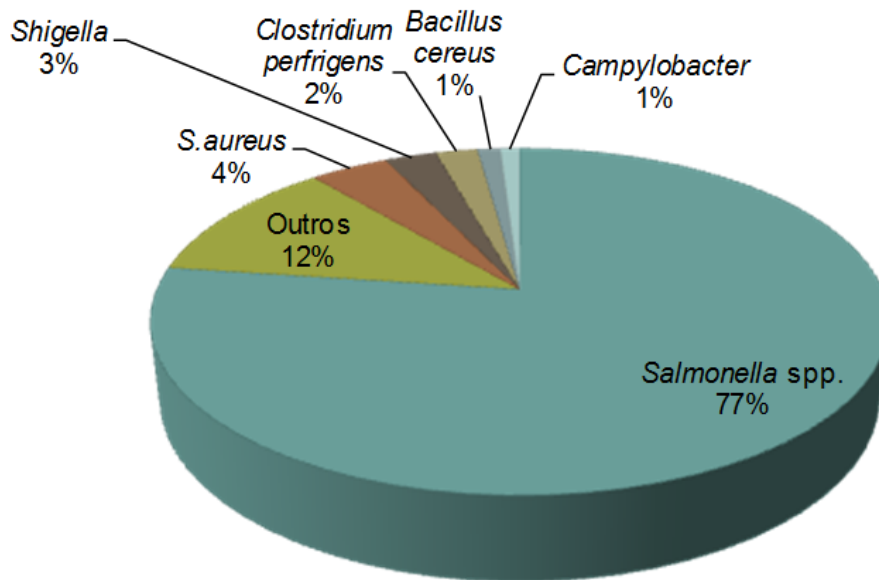


Figura 1: Patógenos implicados em surtos de DTAs na Europa no período entre 1993 e 1998.

Fonte: Adaptado de WHO, 2000.

Apesar da incidência de DTAs ser difícil de estimar devido à baixa notificação, um estudo realizado no período entre 1993 a 1998 em 42 países da Europa, revelou mais de 33307 surtos envolvendo um total de 391383 casos. Na figura 2 estão discriminadas as percentagens correspondentes a cada país relativas a doenças transmitidas por alimentos, intoxicações alimentares estafilocócicas e intoxicações alimentares estafilocócicas em produtos lácteos (WHO, 2000).

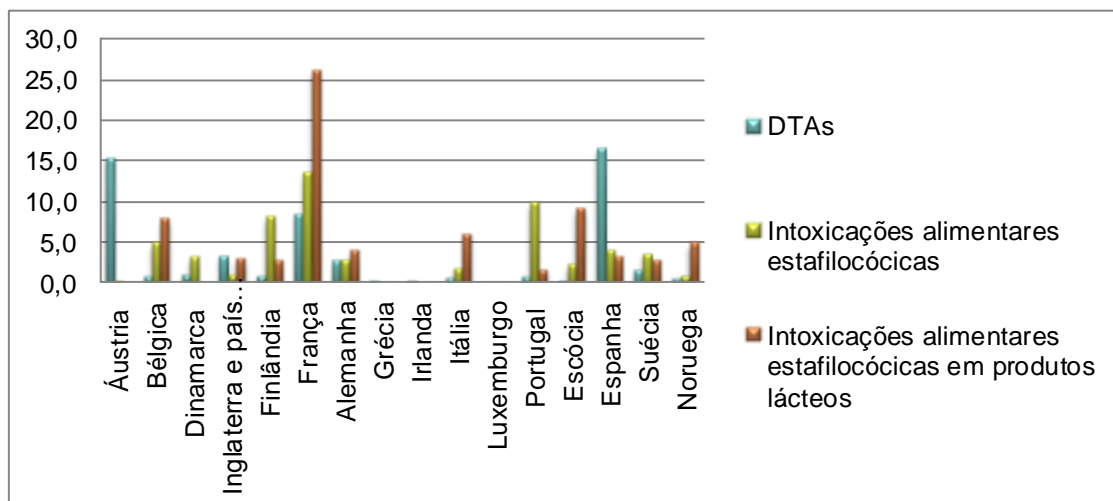


Figura 2: Percentagem de doenças transmitidas por alimentos e intoxicações alimentares estafilocócicas em diferentes países da Europa. Fonte: Adaptado de WHO, 2000.

1.3. Intoxicação Alimentar Estafilocócica

A intoxicação alimentar por *S. aureus* é caracterizada pela ingestão de alimentos que contêm toxinas pré-sintetizadas devido à exposição das bactérias a temperaturas ótimas para a sua produção. Na maioria dos casos, o alimento chega a essa temperatura por falha no processo de refrigeração ou porque essa temperatura é exigida durante o processamento do género alimentício.

Muitos alimentos podem ser meio de crescimento para *S. aureus*, sendo a sua incidência condicionada aos hábitos de consumo de cada país. No Reino Unido, por exemplo, 53% das intoxicações alimentares estafilocócicas relatadas entre 1969 e 1990 deveram-se a produtos de carne, especialmente ao consumo de presunto, 22% dos casos foram devido ao consumo de aves de capoeira, 8% a produtos lácteos, 7% para os peixes e mariscos e 3,5% para o consumo de ovos. Em França, o comportamento difere. Entre as intoxicações alimentares estafilocócicas relatadas no período de 1999 a 2000, os queijos foram responsáveis por 32% dos casos, as carnes por 22%, salsichas e tortas por 15%, peixes e frutos do mar por 11% e ovos por 11% dos casos. Nos Estados Unidos, entre os casos de intoxicação estafilocócica alimentar relatados entre 1975 e 1982, 36% foram motivados por consumo de carne vermelha, 12,3% por saladas, 11,3% por aves, 5,1% por bolos e apenas 1,4% dos casos eram referentes a produtos lácteos e frutos do mar (Le Loir *et al.*, 2003).

Em qualquer caso de intoxicação, as principais fontes de contaminação são os humanos, ao manipularem os alimentos através do contacto manual ou através do trato respiratório, pela tosse e espirros. A contaminação ocorre normalmente após o tratamento térmico dos alimentos. No entanto, em alimentos como a carne crua, salsichas, leite cru e queijo de leite cru, as contaminações podem ter origem animal, tanto devido ao transporte dos animais como a infecções (por exemplo, mastite) (Le Loir *et al.*, 2003).

Os sintomas, por norma, são ligeiros e de curta duração tais como náuseas, vómitos, dores abdominais e diarreia. Todavia, em casos mais severos, podem ocorrer dores de cabeça, câibras musculares, prostração e febres baixas (Dingues *et al.*, 2000). A intensidade dos sintomas pode variar de acordo com o peso corporal, susceptibilidade do indivíduo, estado de saúde da pessoa afectada, concentração da enterotoxina presente no alimento e quantidade de alimento ingerida. A recuperação ocorre em cerca de dois dias podendo, no entanto, em alguns casos estender-se ou exigir

hospitalização (Jablonski e Bohach, 2001). O período de incubação pode variar entre trinta minutos a oito horas, porém os sintomas aparecem entre duas a quatro horas após ingestão do alimento contaminado (Bannerman, 2003).

A intoxicação alimentar estafilocócica é raramente registada devido à não obrigatoriedade em reportar os casos e à sintomologia ligeira e de curta duração (Frazier e Westhoff, 2000). Por esses motivos, existe ainda informação limitada sobre a prevalência de tipos de SE's, ou do seu carácter endémico e/ou epidémico (Martin *et al.*, 2004).

Ocorrência de Surtos de Intoxicação Estafilocócica em produtos lácteos

Os produtos lácteos, bem como outros produtos com um elevado teor de proteínas, são bons substratos, para o crescimento de *S. aureus*. Tais produtos estão envolvidos em doenças transmitidas por alimentos devido a:

- Ocorrência de estafilococos coagulase positiva no leite cru;
- Contaminação cruzada durante o processamento;
- Possível contaminação cruzada durante a distribuição.

Na Europa, surtos de intoxicação por *Staphylococcus* enterotoxigénicos foram controlados em diferentes países, entre 1993-1998. Todos os dados utilizados foram publicados no programa de vigilância da OMS para o controlo de infecções alimentares e intoxicações na Europa.

Os produtos lácteos foram responsáveis por 3,9% dos surtos na Alemanha, 6,7% na Noruega, 5,4% na Bélgica, 9,1% na Escócia, 16% na Espanha, 1,7% em Portugal, 26% na França, 3,0% na Inglaterra e Países de Gales, 3,6% na Itália, 5,0% na Holanda e 1,7 % na Suécia.

Esta visão geral das intoxicações estafilocócicas nos diferentes países europeus indica que os produtos lácteos estavam envolvidos em 4,8% (em média) de todos os alimentos incriminados. No entanto, continuam a ser difíceis de estimar os valores exactos devido às limitações dos sistemas de vigilância. No quadro 1 estão descritos, detalhadamente, as percentagens correspondentes aos diferentes países (European Commission, 2003).

Quadro 1: Percentagens de intoxicações estafilocócicas em produtos lácteos em vários países da Europa.

País	% de intoxicações alimentares por <i>S. aureus</i>	Produtos lácteos	Queijos	Notificação
Austria	0,2	Não há registo		Sim
Bélgica	4,9	5,4	2,5	Não
Dinamarca	3,2	Nenhum		Sim
Inglaterra e país de gales	1,0	3,0	Não há registo	Sim
Finlândia	8,2	1,1	1,7	Não
França	13,6	26,0	Não há registo	Sim
Alemanha	2,8	3,9	0,1	Não
Grécia	Não há registo	Não há registo		Não
Irlanda	Nenhum	Nenhum		Sim
Itália	1,8	3,6*	2,4	
Luxemburgo	Nenhum	Nenhum		Desconhecido
Portugal	9,9	Não há registo	1,7	Não
Escócia	2,3	Não há registo	9,1	Desconhecido
Espanha	4,1	1,6	1,6	Sim
Suécia	3,6	1,1	1,7	Desconhecido
Noruega	0,9	5,0	Não há registo	Sim

Fonte: Adaptado de European Commission, 2003.

Nos estados Unidos, foi reportado que *S. aureus* estava associado a 42 surtos de intoxicações, com 1413 casos notificados e uma morte, entre 1993 e 1997 (Olsen *et al.*, 2000). Leite e queijos estavam entre os alimentos implicados (European Commission, 2003).

No Japão, entre 1987-1996, ocorreram 32 surtos atribuídos a intoxicações estafilocócicas, em escolas e berçários, afectando cerca de 2846 crianças. Em Julho de 2000 houve um outro surto, atribuído ao consumo de iogurtes contaminados com a enterotoxina A, envolvendo 13420 notificações (European Commission, 2003).

No Brasil, os surtos de doenças transmitidas por alimentos têm sido associados, principalmente, ao consumo de queijos tipo Minas frescal e queijo de coalho. No período de 1997 a 2002, vários surtos de intoxicação alimentar, ocorridos em Minas Gerais, foram investigados pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED). As contagens de *Staphylococcus* sp. nos produtos lácteos variavam entre $6,0 \times 10^3$ a $1,8 \times 10^8$ UFC/g e as principais enterotoxinas estafilocócicas implicadas nos surtos eram SEA, SEB e SEC (Veras *et al.* 2008). Conforme os relatórios da FUNED, no período de 1995 a 2001, alimentos contaminados com enterotoxinas estafilocócicas produzidas por *S. aureus* causaram 112 surtos afectando 12.820 pessoas e causando 17 mortes. Todavia a existência destes surtos não se restringe apenas ao estado do Ceará, mas

sim a toda a região do Nordeste, ocorrendo esporadicamente casos em outras regiões do Brasil. No quadro 2 são reportados surtos de intoxicação estafilocócica atribuídos ao consumo de produtos lácteos no Brasil, no período de 1993-2002.

Quadro 2: Relatos de surtos de Intoxicação estafilocócica relativos ao consumo de produtos lácteos entre 1993 e 2002 no Brasil.

Local	Veículo	Nº de pessoas
Belo Horizonte-MG	Queijo	3
Belo Horizonte-MG	Queijo	8
Belo Horizonte-MG	Queijo	3
Arapongas-PR	Queijo colonial	7
Curitiba-PR	Queijo	3
Curitiba-PR	Queijo	4
Curitiba-PR	Queijo	4
P.Fontim-PR	Queijo	5
Viamão-RS	Queijo	4
Rio Grande-RS	Queijo	12
Caxias do Sul-RS	Queijo colonial	8
Quedas de Iguaçu-PR	Queijo	4
Porto Alegre-RS	Queijo colonial	3
Fortaleza-CE	Queijo	7
Autazes-AM	Queijo	4

Fonte: Adaptado de Borges *et al*,2008.

1.4. *Staphylococcus aureus*

O termo *Staphylococcus* foi mencionado pela primeira vez pelo cirurgião escocês, Sir Alexander Ogston, em artigos publicados entre 1879 e 1882, onde descreveu a presença desta bactéria em pus obtido de abscessos humanos. Dois anos mais tarde, Rosenbach relatou o crescimento da mesma bactéria em cultura pura, dando o nome *Staphylococcus aureus* às colônias de pigmentação laranja.

O primeiro caso de intoxicação alimentar associada a *S. aureus*, foi registrado em 1884 por Vaughan e Sternberg. Estes investigadores descobriram que o surto tinha sido

motivado pela ingestão de queijo contaminado por organismos esféricos designados na época de “micrococos”. Contudo, só trinta anos mais tarde, em 1914, se demonstrou claramente a intoxicação alimentar estafilocócica após consumo de leite sem refrigeração proveniente de uma vaca com mastite estafilocócica. Desde então, foi demonstrado que *S. aureus* é um patógeno habitual em surtos de intoxicações alimentares por todo mundo, sendo por esse motivo considerado um importante problema de Saúde Pública (ICMSF, 1996; Ortega *et al*, 2010).

As bactérias do género *Staphylococcus* são patógenos humanos e de outros mamíferos. Até a data, foram descritas 41 espécies e 24 subespécies diferentes, com base na capacidade de coagular o plasma (reação de coagulase) (Euzéby, 2008). A coagulase é uma das enzimas mais importantes produzidas por *S. aureus*. Vários estudos provaram que há 93-100% de correlação entre a produção de coagulase e a produção de enterotoxinas (Hui *et al.*, 2001).

Entre as espécies coagulase positiva, *S. aureus* é a mais envolvida em surtos de intoxicação alimentar pela habilidade de produzir exotoxinas superantigénicas (Dingues *et al.*, 2000), porém não devem ser desprezadas as outras espécies produtoras de coagulase, *S. intermedius* e *S. hyicus* que também estão implicadas em alguns surtos (Borges *et al.*, 2008). Apesar das espécies coagulase negativa não fazerem parte dos parâmetros analisados no controlo microbiológico habitual, estudos sugerem que estas podem ser potenciais causadoras de intoxicações alimentares, tendo sido relatados até ao momento três casos.

S. aureus são bactérias Gram-positivas, imóveis, não esporuladas, de forma esférica, podendo medir entre 0,5 a 1,0 µm. Estas bactérias podem ocorrer em formas isoladas, em pares ou agrupadas em formas irregulares também designadas de “cachos”. As suas colónias apresentam uma coloração amarelada em meios ricos e crescidas a 37 °C. São anaeróbios facultativos, podem crescer numa gama de temperaturas entre 7 a 48 °C e em concentrações de NaCl entre 10% a 20%. Todas as estirpes de *S. aureus* são catalase positiva e oxidase negativa.

Os estafilococos são ubíquos no meio ambiente e existem no ar, água, esgotos, poeira, superfícies ambientais, humanos e animais (European Commission, 2003). São correntemente encontrados perto de aberturas da superfície do nosso corpo, como narinas, axilas e zonas inguinal e perineal, onde em habitats húmidos, os números podem oscilar entre 10^3 - 10^6 por cm^2 , e em habitats secos, entre 10 - 10^3 . Os principais veículos de contaminação cruzada dos alimentos por *S. aureus* são as narinas e as mãos. Outro habitat comum destes patógenos é as mastites

estafilocócicas (bovinas e caprinas), conhecidas entre os rebanhos leiteiros. Quando o leite infectado é consumido ou usado para fazer queijo, a probabilidade de contrair intoxicações alimentares é maior (Jay, 1996).

1.5. Factores de Patogenicidade de *Staphylococcus aureus*

S. aureus está implicado numa ampla gama de infecções em humanos e em diferentes espécies animais (Zschöck *et al.*, 2005). É considerado o patógeno mais comum nas mastites bovinas contagiosas, levando a perdas economicamente relevantes na indústria leiteira, reduzindo a qualidade do leite (Zecconi *et al.*, 2006). Esta bactéria produz e secreta 30 ou mais factores de patogenicidade específicos que interferem com as defesas do hospedeiro (Dinges *et al.*, 2000).

S. aureus pode provocar infecções e doenças causadas por toxinas (Novak, 1999). As infecções podem ser localizadas, tais como furúnculos, impetigos, infecções pós-cirúrgicas, osteomielites, pneumonias, endocardites, meningites, ou infecções disseminadas como bacteremia e septicemia. As doenças originadas por toxinas também ostentam importantes manifestações clínicas, como celulite, intoxicação alimentar, síndrome do choque tóxico e síndrome da pele escaldada (Arbuthnott *et al.*, 1990; Corbella *et al.*, 1997).

Vários factores estão implicados na patogenicidade destas bactérias, entre eles um grande número de proteínas extracelulares e outros factores de virulência. Algumas destas proteínas, incluindo citotoxinas e exoenzimas, são secretadas; outras, incluindo a proteína A e várias adesinas, fixam-se na parede celular dos hospedeiros. Estas proteínas, juntas, habilitam o microrganismo a escapar das defesas do hospedeiro, aderir às células e moléculas da matriz intercelular, invadir ou destruir as células do hospedeiro e a propagar-se dentro dos tecidos (Novick, 2003). Apesar do mecanismo de patogenicidade da *S. aureus* ainda não estar completamente esclarecido, sabe-se que as suas exotoxinas superantigénicas (enterotoxinas (SEs) e a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1)) detêm o papel principal. São consideradas superantigénios, por estimularem uma resposta policlonal inespecífica de linfócitos T e a produção aumentada de citocinas, causando toxicidade sistémica e supressão da resposta imune adaptativa (Ortega *et al.*, 2010).

1.6. Enterotoxinas Estafilocócicas e genes codificadores

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs), assim como as exotoxinas pirogênicas estreptocócicas (PT), pertencem a uma grande família de exotoxinas pirogênicas. Elas apresentam em comum relações filogenéticas, estrutura, função e homologia de sequência. Estas toxinas podem causar uma síndrome semelhante ao choque tóxico (TSST-1 like) e têm sido implicadas em intoxicações alimentares e diversas doenças alérgicas e auto-imunes (Balaban *et al.*, 2000).

As enterotoxinas são pequenas proteínas secretadas, com baixa massa molecular, 26-30 kDa, de cadeia simples, ponto isoeletrico entre 7,0-8,6 e solúveis em água e soluções salinas. São ricas em aminoácidos tais como: lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e resíduos de tirosina. A maioria possui uma ança de cistina, essencial para a sua configuração e que está envolvida na sua actividade emética. São resistentes à acção de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, permanecendo activas mesmo após ingestão. A produção destas toxinas ocorre durante toda a fase do crescimento bacteriano, mas preferencialmente durante a fase exponencial. Elas têm em comum não só propriedades estruturais e bioquímicas, mas também a notável capacidade de serem termoestáveis, resistindo a tratamentos térmicos como a pasteurização e a ultrapasteurização.

Até ao momento, foram descritas 18 enterotoxinas distintas, sendo a sua classificação baseada nas suas características antigénicas e nomeadas com as letras do alfabeto por ordem cronológica da sua descoberta. As SEs descritas na literatura podem ser observadas no quadro 3 (Borges *et al.*, 2008).

Quadro 3: Tipos de Enterotoxinas Estafilocócicas (SE) e genes codificadores.

Tipos de SE	Gene codificante	Referência
SEA	<i>sea</i>	Casman, 1960
SEB	<i>seb</i>	Bergdoll <i>et al.</i> , 1959
SEC1	<i>sec₁</i>	Bergdoll <i>et al.</i> , 1965; Borja and Bergdoll, 1967
SEC2	<i>sec₂</i>	Bergdoll <i>et al.</i> , 1965; Avena and Bergdoll, 1967
SEC3	<i>sec₃</i>	Reiser <i>et al.</i> , 1984
SED	<i>sed</i>	Casman <i>et al.</i> , 1967
SEE	<i>see</i>	Bergdoll <i>et al.</i> , 1971
SEG	<i>seg</i>	Betley <i>et al.</i> , 1992; Munson <i>et al.</i> , 1998
SEgv	<i>segv</i>	Blaiotta <i>et al.</i> , 2004
SEH	<i>seh</i>	Ren <i>et al.</i> , 1994; Su and Wong, 1995
SEI	<i>sei</i>	Munson <i>et al.</i> , 1998
SElv	<i>seiv</i>	Blaiotta <i>et al.</i> , 2004
SEJ	<i>sej</i>	Zhang <i>et al.</i> , 1998
SEK	<i>sek</i>	Orwin <i>et al.</i> , 2001
SEL	<i>sel</i>	Fitzgerald <i>et al.</i> , 2001
SEM	<i>sem</i>	Jarraud <i>et al.</i> , 2001
SEM	<i>sen</i>	Jarraud <i>et al.</i> , 2001
SEnv	<i>senv</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> , 2004
SEUv	<i>seu v</i>	Blaiotta <i>et al.</i> , 2004

Fonte: Adaptado de Borges *et al.*, 2008.

Aproximadamente 95% dos casos de intoxicação alimentar estafilocócica são causados pelas enterotoxinas ditas “clássicas”, as SE’s dos tipos SEA a SEE (Cremonesi *et al.*, 2005). No quadro 4 estão resumidas as principais características físicas e químicas das enterotoxinas clássicas.

Quadro 4: Características físicas e químicas das enterotoxinas clássicas SEA-SEE.

	SEA	SEB	SEC1	SEC2	SEC3	SED	SEE
Resíduos de aminoácidos							
(Enterotoxina)	233	239	239	239	238	228	230
(Gene codificador)	257	266	266	266	266	258	257
Massa molecular							
(Enterotoxina)	27.078	28.494	27.500	27.531	27.438	26.360	26.425
(Gene codificador)	29.700	31.400	30.511	30,608	-	-	29.358
Ponto isoeléctrico	6,8	8,6	8,6	7,0	8,15	7,4	7,0
Dose emética (ED₅₀ µg por macaco)	5	5	5	5-10	<10	20	10-20
Pico de absorção máxima (nm)	277	277	277	277	-	278	277
Conteúdo em azoto (%)	16,5	16,1	16,2	16,0	-	-	-

Fonte: Adaptado de Hui *et al*, 2001.

As enterotoxinas estafilocócicas e as toxinas da síndrome do choque tóxico (TSST) são de particular interesse para os imunologistas devido as suas características de “superantígenos” e à capacidade de se ligarem às moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II. Esta ligação causa a estimulação intensiva de células T que, conseqüentemente provocam a libertação de citocinas. A capacidade das enterotoxinas se ligarem às moléculas do MHC II e o facto de causarem a produção de citocinas têm sido indicado por vários investigadores como causa da resposta endémica após ingestão das mesmas (Ortega *et al.*,2010).

Os genes que codificam as enterotoxinas estafilocócicas já foram estudados, e as suas designações iniciam com as letras *se* de *Staphylococcal enterotoxin* ou *ent* de enterotoxina, sendo a primeira forma a mais aplicada na actualidade (Freitas *et al.*, 2004). Muitos dos genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas podem ser encontrados em bacteriófagos (*sea*, *sed*, *see* e *sej*), plasmídeos (*seh* e *sep*), cromossomas (*seh* e *sep*) e em ilhas de patogenicidade (*seb*, *sec*, *seg*, *segv*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *sek*, *sel* e *seq*) (Borges *et al.*, 2008).

O gene para SEA (*sea*) é constituído por 771 pb e codifica uma proteína de 27,1 kDa (Luz, 2008). Esta toxina é expressa a meio da fase exponencial do crescimento bacteriano (Tremaine *et al.*, 1993). A pesquisa do gene *sea* em isolados de *S. aureus* é de extrema importância, não só pela toxina SEA revelar toxicidade a concentrações tão baixas como 100-200 ng (Evenson *et al.*, 1988; Asao *et al.*, 2003), como, é a enterotoxina mais comum envolvida em intoxicações alimentares seguida por SED e SEB (Balaban e Rasooly, 2000).

O gene *seb* é composto por 798 pb e codifica a proteína de 31,4 kDa (Johns e Khan, 1988). O facto da enterotoxina B ser facilmente aerosolizada e apresentar boa estabilidade levou a que esta se tornasse uma potencial arma biológica na década de 70 do século passado (Dinges *et al.*, 2000). Apesar de o tratamento ser rápido, quando inalada em doses elevadas, vários órgãos são acometidos e o desfecho quase sempre é trágico. A SEB é classificada como um “superantigénio”, sendo que uma dose de 0,0004 µg por quilo de massa corporal é incapacitante para 50% dos infectados sendo a dose letal para 50% dos infectados (DL₅₀) de apenas 0,02 µg/kg.

A enterotoxina SEC possui algumas variantes, nomeadas de SEC1, SEC2, SEC3, SECbovina e SECovina. Estas foram classificadas com base nas diferenças antigénicas e no animal hospedeiro ao qual estão associadas (Marr *et al.*, 1993). O gene *sec1* tem 801 pb e codifica uma proteína de 27,4 kDa (Bohach e Schlievert, 1987), o gene *sec2* tem 801 pb e codifica uma proteína de 26 kDa (Bohach e Schlievert, 1989) e o gene *sec3* tem 798 pb e codifica uma proteína de 27,4 kDa (Couch e Betley, 1989). SEC2 e SEC3 são os subtipos de SECs mais frequentes em surtos de intoxicação alimentar (Chen *et al.*, 2004). SEC é a enterotoxina mais reportada em produtos lácteos de origem bovina, ovina e caprina (Hirooka *et al.*, 1988).

O gene *sed* foi encontrado no plasmídeo da penicilinase de 27,6 kb e codifica uma proteína de 26,3 kDa (Bayles e landolo, 1989). A enterotoxina D é produzida normalmente em quantias reduzidas, no entanto, a sua toxicidade não deve ser menosprezada, visto que doses entre 100 a 200 ng podem causar doença, especialmente, em crianças e idosos (Kokan e Bergdoll, 1987).

O gene para SEE (*see*) codifica uma proteína de 29 kDa (Couch *et al.*, 1989) que apresenta homologia com SEA e SED, no entanto, maior homologia (81%) com SEA (Balaban e Rasooly, 2000).

Quanto à regulação das SE's, *S. aureus* desenvolveu um conjunto de genes acessórios que são responsáveis pela regulação e expressão de outros genes (*se* e *tst*). O gene acessório mais estudado até ao momento é o sistema de *agr* que age em conjunto com o gene *sar*. A expressão do gene *agr* está estreitamente ligada ao número de bactérias na população, sendo que, contagens elevadas (> a 10⁶ UFC/g) têm um papel crucial na capacidade de produção das SE, tais como as SEB, SEC, SED e TSST-1 (Novick, 2000). Contudo, não se pode generalizar a todas as SEs. Estudos demonstraram que SEG e SEI são produzidas em baixas concentrações da bactéria (Munson *et al.*, 1998).

1.7. Factores que afectam o crescimento, sobrevivência de *S. aureus* e a produção e destruição de enterotoxinas estafilocócicas

Diversos são os factores que podem afectar o crescimento, sobrevivência de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas estafilocócicas. Contudo, podem se destacar a temperatura, pH, actividade da água, radiações e gases.

S. aureus é muito resistente à congelação e descongelação e sobrevive em alimentos conservados a temperaturas menores ou iguais a -20 °C. Contudo, a temperaturas de -10 °C a 0 °C a viabilidade destas bactérias decresce notavelmente durante a conservação por congelamento. Assim, como as bactérias, as toxinas estafilocócicas demonstraram ser bastante resistentes e estáveis à congelação.

O crescimento bacteriano é óptimo entre 35 °C a 45 °C, estipulando-se os seus limites em 7 e 48 °C. A 10 °C, a fase lag é prolongada e o crescimento é lento, a temperatura inferiores o crescimento é limitado por pequenos abaixamentos da actividade da água e do pH.

A produção de enterotoxinas ocorre numa gama mais estreita de temperaturas, uma vez que esta afecta a qualidade e a taxa de produção das mesmas. A temperatura mínima para a produção de enterotoxinas é aproximadamente 10 °C. A esta temperatura, a taxa de produção da enterotoxina é muito lenta. A temperatura máxima é 45 °C, contudo este limite pode ser aumentado em vários graus na presença de cloreto de sódio a 1M. *S. aureus* é facilmente destruída pelas temperaturas de pasteurização ou através dos processos de esterilização dos alimentos, todavia as enterotoxinas são extraordinariamente resistentes aos vários tratamentos térmicos. (Sneath *et al.*, 1986; ICMSF, 1996).

Considerando optimizados os outros parâmetros, *S. aureus* pode crescer num intervalo de pH entre 4 e 10. Na presença de ácidos inorgânicos, tais como HCl, *S. aureus* pode crescer a pH inferior a 4,3, porém na presença de ácidos orgânicos, os limites de pH são aumentados. A produção de enterotoxinas surge num intervalo análogo, não oscilando muito dos valores estipulados para o crescimento bacteriano (ICMSF, 1996; Hui *et al.*, 2001).

S. aureus é um dos contaminantes alimentares mais tolerante, cresce a uma actividade de água tão reduzida como 0,85, contudo o crescimento óptimo ocorre a um a_w de 0,98 (ICMSF, 1996). É facilmente destruído pelas radiações ionizantes e não ionizantes. Já as enterotoxinas são extremamente resistentes às radiações gama e

não são destruídas pelas doses utilizadas na esterilização dos alimentos. Em relação a presença de gases, *S. aureus* cresce em aerobiose e anaerobiose, contudo o crescimento é mais lento em anaerobiose. As toxinas estafilocócicas têm o mesmo comportamento. Em aerobiose, têm uma gama mais ampla de temperaturas e de pH. No entanto, a destruição de ambas é dificultada em condições anaeróbicas. No quadro 5 estão resumidos os principais factores que afectam o crescimento bacteriano e a produção de toxinas (Hui *et al.*, 2001).

Quadro 5: Limites do crescimento bacteriano e da produção de enterotoxinas

Factor	Crescimento		Produção das toxinas	
	Ótimo	Intervalo	Ótimo	Intervalo
Temperatura (°C)	37	7-48	40-45	10-48
pH	6-7	4-10	7-8	4,5-9,6
Actividade de água (a_w)	0,98	0,83-0,99	0,98	0,87-0,99
Atmosfera	Aeróbica	Anaeróbica-aeróbica	Aeróbica	Anaeróbica-Aeróbica

Fonte: Adaptado de ICMSF, 1996.

Estes factores, apesar de serem os mais estudados e referênciados, não são os únicos a desempenharem um papel fulcral no crescimento bacteriano e na produção ou inibição da produção das enterotoxinas. Factores como a presença de certos aminoácidos, açucares bem como a competição microbiana tem também sido alvo de estudo. Estudos revelaram que aminoácidos como a valina, arginina e a cistina estão estritamente implicados no crescimento e na produção de SE em algumas estirpes de *S. aureus*, nomeadamente, das toxinas SEA, SEB e SEC. Já a glucose demonstrou ter um efeito inibitório sobre a produção de SE, especialmente para SEB e SEC (Bergdoll *et al.*, 1989). Este efeito inibitório foi atribuído a uma queda no pH, como consequência do metabolismo da glucose. Estas observações também indiciam que glucose e valores pH baixos têm um efeito inibidor sobre a expressão de *agr* (Novick, 2000).

Além disso, *S. aureus* é bastante sensível à competição microbiana, tendo-se demonstrado que quanto maior a concentração de microorganismos concorrentes, menor a taxa de crescimento de *S. aureus* e a produção de SE. Este acontecimento tem sido particularmente estudado em leites e queijos (Vernozy-Rozand *et al.*, 1998).

1.8. Técnicas moleculares na pesquisa de Enterotoxinas Estafilocócicas

Os métodos que têm sido desenvolvidos para a detecção de enterotoxinas em alimentos são diversificados. Basicamente resumem-se a ensaios biológicos e imunológicos. Os métodos tradicionais implicavam testes em animais, o que era dispendioso, complexo e levantava muitas questões éticas. Estes foram substituídos por ensaios imunológicos mais sensíveis e específicos (Hui *et al.*, 2001).

O procedimento clássico para detectar enterotoxinas estafilocócicas em alimentos é uma combinação de extracção, concentração e detecção final através de uma técnica imunológica, podendo ser a técnica de Ouchterlony, ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), *Western Blot*, PCR, Imunodifusão, aglutinação em látex entre outras.

O método de Ouchterlony apesar de ser o pioneiro e poder detectar 0,1 µg de toxina em 100 g de alimento é um método lento e trabalhoso sendo mais tarde substituído pela técnica ELISA que é mais rápida, ou pela técnica de aglutinação com partículas de látex, que é capaz de detectar 0,1-10 ng de enterotoxina em 1 ml de amostra (ICMSF, 1996; Santilliano *et al.*, 2011).

A técnica *Western blot* surgiu como resposta a alguns problemas associados com os ensaios de *ELISA*. É um método largamente usado na análise de proteínas e, assim, tem sido utilizado para detectar as enterotoxinas SEA e SEC (Santilliano *et al.*, 2011). As proteínas são separadas por tamanho, usando a electroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e, transferidas para uma membrana, onde são, então incubadas com anticorpos específicos. Neste teste rápido, as proteínas são detectadas com base na reacção com anticorpos específicos, evitando assim o surgimento de resultados falsos-positivos originados pela interferência de proteínas contaminantes (Santilliano *et al.*, 2011).

A utilização da técnica da PCR (Reacção em cadeia da polimerase) tem sido descrita em diversos trabalhos. Esta técnica utiliza sequências específicas, também designados de *primers*, para os genes codificantes das enterotoxinas. É um método com alta sensibilidade e precisão, todavia, esta técnica não permite a detecção directa das toxinas no material biológico, mas sim identificar se as estirpes em estudo são portadoras dos genes codificantes (Cremonesi *et al.*, 2005). No quadro 6 são apresentadas as principais características das diferentes técnicas utilizadas na detecção de enterotoxinas estafilocócicas.

Quadro 6: Principais características dos diferentes métodos de detecção de enterotoxinas

Técnica de detecção	Vantagem	Desvantagem	Sensibilidade	Especificidade	Custo por amostra	Tempo necessário
Ouchterlony	Aprovada pela AOAC e adoptada pela FDA	Muito morosa	100 ng/ml	Tipagem	Baixo	18-72 horas
ELISA	Sensibilidade	Não distingue a proteína produzida por <i>S. aureus</i>	0,2 ng/ml	Tipagem	Moderado	1, 5-4 horas
Radioimuno-ensaio	Sensibilidade	Utiliza material radioactivo	1 ng/ml	Tipagem	Moderado	3-4 horas
Western blot	Solubilização dos agregados proteicos	Necessita de equipamentos exclusivos	100 pg/ml	Tipagem	Moderado	4-6 horas
Aglutinação em látex	Rapidez	Custos elevados	2,5 ng/ml	Tipagem	Baixo	20 min
Microarranjo	Sistematização	Exige profissional qualificado	100 pg/ml	Tipagem	Alto	1,5 horas
PCR	Sensibilidade e especificidade	Exige profissional qualificado, conhecimento da sequência a amplificar	1 pg/mL	Todos os genes	Alto	4-6 horas
Biológico	Possibilidade de visualização do efeito causado pela toxina	Utiliza animais	10 pg/mL	Inespecífico	Alto	15 min-6 horas

Fonte: Adaptado de Santiliano *et al.*, 2011.

1.9. Reacção em cadeia pela Polimerase (PCR)

A metodologia revolucionária da reacção de polimerização em cadeia foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80 do século passado. Esta descoberta causou uma verdadeira revolução na Biologia, tanto na pesquisa visando a compreensão de processos biológicos fundamentais, como nas áreas aplicadas, envolvendo diagnósticos e melhoramentos genéticos (Antonini *et al.*, 2004).

Esta técnica permite a obtenção de um fragmento específico de DNA por meio da sua duplicação de modo exponencial. A alta sensibilidade da PCR, bem como a sua especificidade, possibilita a amplificação de uma sequência alvo de uma amostra com baixo grau de pureza e em quantidades tão pequenas como 1 pg de DNA, o que

corresponde a 10 UFC/mL (Cremonesi *et al.*, 2005). Assim, um gene presente no genoma como única cópia pode ser amplificado a partir de DNA genómico complexo, podendo ser posteriormente visualizado como uma banda discreta, por meio de uma electroforese em gel de agarose após coloração com brometo de etídeo.

O princípio da PCR implica três etapas, estando presentes na reacção de síntese de qualquer DNA. Estas etapas são repetidas por várias vezes em ciclos:

1. Desnaturação térmica do DNA molde.
2. Emparelhamento de oligonucleotídeos sintéticos, que funcionam como iniciadores da reacção de polimerização, a cada uma das sequências de DNA molde.
3. Polimerização de novas sequências de DNA, a partir de cada um dos iniciadores, utilizando cada um dos quatro dNTP (dATP, dCTP, dTTP e dGTP).

Uma reacção típica de polimerização em cadeia é constituída pelos seguintes componentes: a enzima *Taq* DNA polimerase e o seu respectivo tampão de reacção; os desoxirribonucleótidos trifosfato (irão funcionar como substrato da reacção de polimerização); o par de oligonucleotídeos que funcionarão com iniciadores e o catião bivalente magnésio (Mg^{2+}).

A técnica da PCR tem sido uma importante ferramenta na identificação e avaliação do potencial enterotoxigénico de *Staphylococcus* spp.. Apesar desta técnica apenas permitir a identificação das estirpes portadoras dos genes para as toxinas, independente da sua expressão e secreção, vários protocolos tem sido desenvolvidos de forma a aperfeiçoar e a viabilizar os seus resultados (Meyrand *et al.*, 2000; Boerema *et al.*, 2006; Cremonesi *et al.*, 2006).

1.10. Enquadramento do trabalho e objectivos

Como já foi referido a contaminação de queijo de coalho por *S. aureus*, produzido nos vários estados do Nordeste Brasileiro, variou entre 10^3 e 10^6 UFC/g (Luz, 2008). Estes valores são preocupantes, uma vez que se encontram acima dos limites estabelecidos pelos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e da Saúde, cujo valor máximo permitido é 10^3 UFC/g (Anónimo, 1996; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001). Concentrações superiores a 10^5 UFC/g favorecem a produção de enterotoxinas estafilocócicas (Forsythe *et al*, 2000) pondo em risco a saúde do consumidor. Estes factos levam a que vários trabalhos de pesquisa sejam desenvolvidos no Nordeste Brasileiro de forma a desenvolver estratégias para minimizar a contaminação neste produto e a avaliar o perfil enterotoxigénico destas bactérias.

A parte experimental deste trabalho teve lugar no Laboratório de Controlo e Qualidade dos Alimentos, na Faculdade de Nutrição da UFAL, na cidade de Maceió-AL, Brasil, ao abrigo das Bolsas Luso-Brasileiras do Santander-Totta.

O principal objectivo deste estudo centrou-se na determinação da prevalência de genes enterotoxigénicos em 40 isolados de *Staphylococcus coagulase positiva* de sete amostras de queijo de coalho do sertão Alagoano. Assim sendo, os objectivos específicos que orientaram a realização deste estudo foram:

1. Avaliar a qualidade microbiológica das sete amostras de queijo de Coalho.
2. Isolar e identificar espécies coagulase positiva através de testes bioquímicos (teste da catalase e teste da coagulase).
3. Avaliar a incidência e a associação dos genes enterotoxigénicos através da análise dos perfis obtidos pela técnica PCR para cada um dos isolados.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção e colheita de amostras

Foram analisadas sete amostras de queijo, provenientes de quatro marcas industriais do sertão Alagoano. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas para o laboratório de Controle e Qualidade dos Alimentos da Faculdade Federal de Alagoas, onde foram realizadas a enumeração e/ou pesquisa de *Staphylococcus* spp., *Salmonella* sp., *Listeria* e coliformes totais e fecais, conforme a metodologia descrita no Manual Analítico de Bacteriologia/FDA (FDA, 1992). É importante referir que as amostras nem sempre foram analisadas no dia de chegada ao laboratório, especialmente quando recepcionadas às sextas-feiras, visto que a pesquisa de *Salmonella* spp., *Listeria* sp., *Staphylococcus aureus* e coliformes é extensiva e requer seguimento.

As amostras de queijo foram gentilmente cedidas pelo Sr. Gustavo da Cooperação de Produção Leiteira de Alagoas –CPLA.

2.2. Avaliação Microbiológica do Queijo de coalho

Avaliação microbiológica de queijo de coalho veio dar continuidade ao estudo já iniciado pelo laboratório de Controle e Qualidade dos Alimentos, perfazendo assim um total de 134 amostras analisadas até à data

2.2.1. Enumeração de Coliformes Totais e Fecais

Determinação do Número Mais Provável de Coliformes Totais (NMP/g).

Para contagem de coliformes totais utilizou-se a técnica de tubos múltiplos pelo número mais provável (NMP). Homogeneizou-se 25 g de queijo de coalho em 225 mL de água peptonada tamponada (APT) (Difco, Detroit, EUA) (diluição 10^{-1}) e prepararam-se três diluições decimais (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Inoculou-se 1 mL de cada diluição, em triplicado. O meio utilizado foi Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) (Difco, Detroit, EUA) e incubou-se a 35 °C durante 48 horas. Decorrido o tempo de incubação, separaram-se os tubos presuntivamente positivos, com turvação e produção de gás no

interior dos tubos de Durham. Fez-se a confirmação com Caldo Verde Brilhante Bile 2% (Difco, Detroit, EUA) nas mesmas condições de tempo e temperatura.

Determinação do Número Mais Provável de Coliformes Termotolerantes

Para contagem de coliformes a 45 °C, transferiu-se uma ançada de cada tubo de caldo LST para outro contendo caldo *Escherichia coli* (EC) (Difco, Detroit, EUA). Incubou-se em banho de água termostetizado a 45 °C durante 24-48 horas. Foram seleccionados os tubos positivos (turvos e com formação de gás no interior dos tubos Durham). Utilizou-se a tabela NMP para calcular o número mais provável de coliformes a 45 °C por grama de alimento. Na figura 3 está esquematizada a metodologia para enumeração de coliformes.

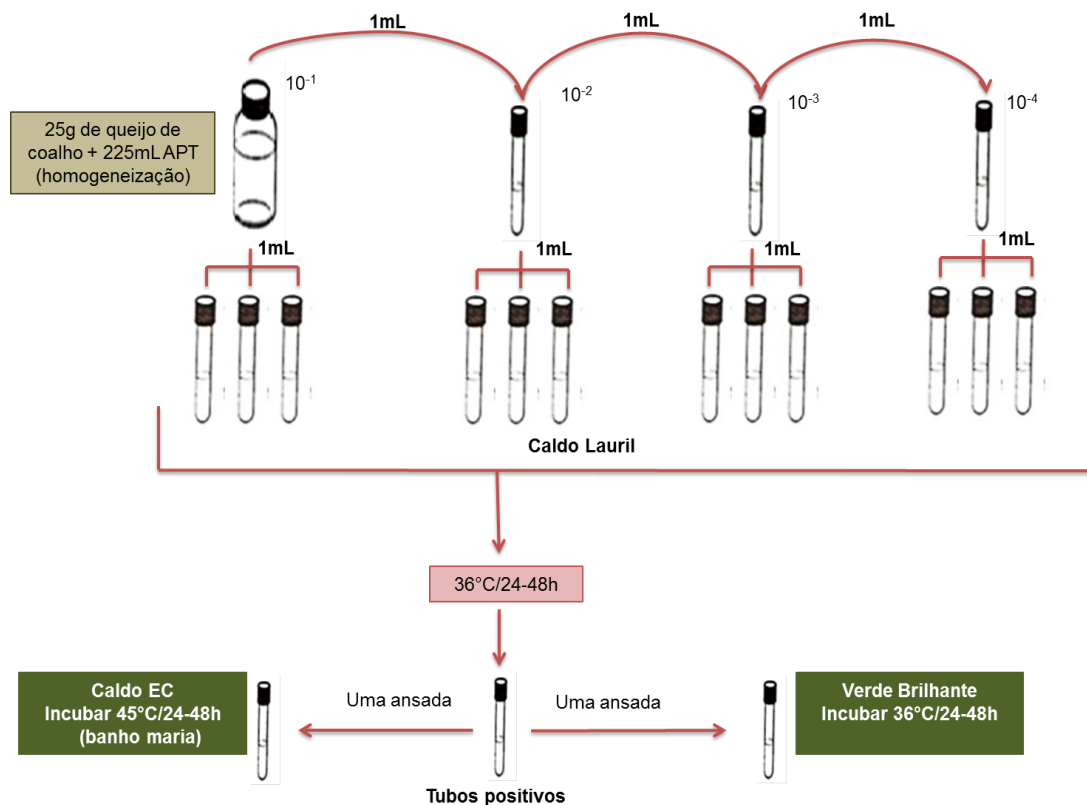


Figura 3: Esquematização da enumeração de coliformes totais e fecais

Fonte: Adaptado de Manual Analítico de Bacteriologia/FDA

2.2.2. Pesquisa de *Salmonella* spp.

A metodologia de pesquisa de *Salmonella* spp. é extensiva e exige várias etapas. Na figura 4 estão esquematizadas as principais etapas.

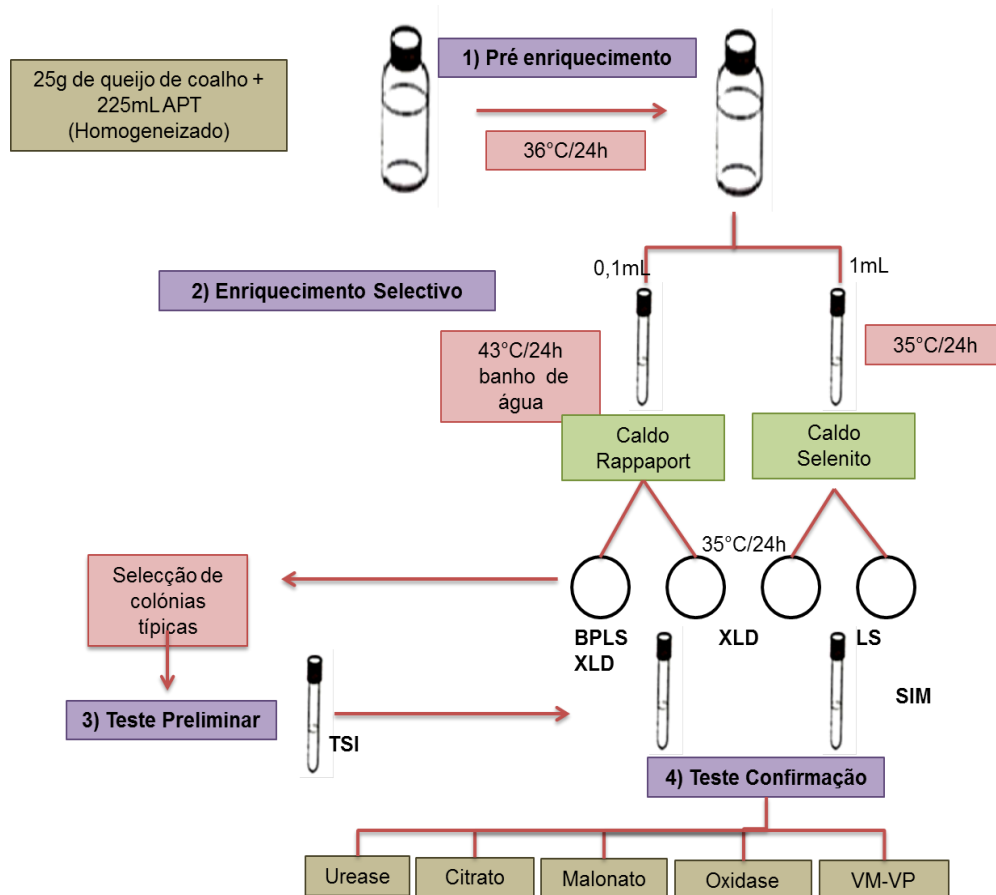


Figura 4: Esquematização das análises de pesquisa de *Salmonella* spp.

Fonte: Adaptado de Manual Analítico de Bacteriologia/FDA

2.2.2.1. Cultura, isolamento e seleção

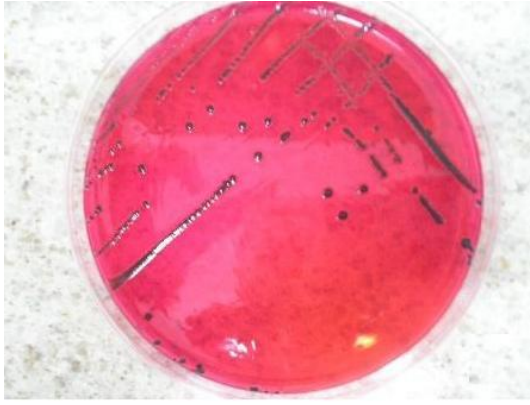
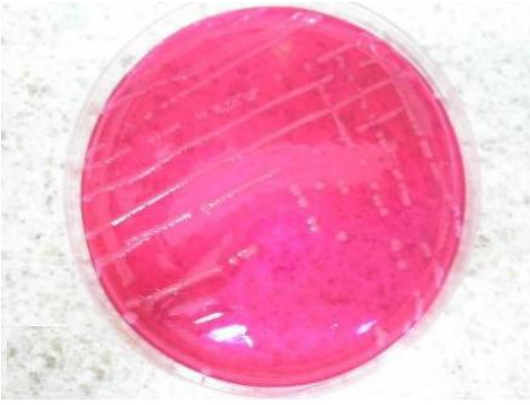
Uma alíquota de 25 g de queijo de coalho foi diluída em 225 mL de solução peptonada tamponada, homogeneizada em Stomacher e incubada a 36 °C por 24 horas (Pré-enriquecimento).

Posteriormente pipetaram-se volumes de 0,1 mL das amostras pré-enriquecidas para tubos com 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (Difco, Detroit, EUA) e volumes de 1 mL para tubos com 10mL de caldo selenito cistina (Difco, Detroit, EUA). Os tubos com caldo Rappaport foram incubados a 43 ± 0,5 °C sob banho de água termostaticado durante 24 horas. Os tubos com caldo selenito foram incubados a 35 ± 0,5 °C, durante 24 horas. A partir dos caldos de enriquecimento selectivo (Rappaport e Selenito

Cistina) foram realizadas inoculações por riscado em placas de XLD (ágar de desoxicolato-lisina-xilose) e BPLS (agar bismuto sulfito) (Difco, Detroit, EUA) de forma a obter-se colónias isoladas.

De acordo com as colónias típicas em cada meio de cultivo seleccionaram-se entre 3 colónias suspeitas por amostra. As características das colónias típicas em BPLS e XLD estão descritas no quadro 7.

Quadro 7: Meios de cultura e características das colónias típicas de *Salmonella* spp.

Meios de Cultura	Características das colónias
<p style="text-align: center;">Ágar XLD</p> 	<p>Colónias de cor rosa escuro, com centro preto e uma zona avermelhada levemente transparente em redor.</p> <p>Estirpes H₂S (+): podem apresentar colónias com centro preto grande ou mesmo todas pretas.</p> <p>Estirpes H₂S (-): produzem colónias de cor rosa com o centro mais escuro, mas não preto.</p> <p>Estirpes lactose ou sacarose (+): produzem colónias amarelas com ou sem centro preto.</p>
<p style="text-align: center;">Ágar BPLS</p> 	<p>Colónias incolores, ou de cor rosada, entre translúcidas a ligeiramente opacas. Quando rodeadas por Microrganismos fermentadores de lactose, podem apresentar-se de cor verde-amarelada.</p>

Fonte: Foto por Ângela Fonte

2.2.2.2. Testes Preliminares

Reacção em agar TSI

Colónias típicas de *Salmonella* spp. foram inoculadas através de picada em profundidade e riscado em cunha de agar TSI. Incubaram-se a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. A maioria das salmonelas apresenta, em TSI (Triple Sugar Iron) (Difco, Detroit, EUA) as seguintes características: ácido na base (fundo), o que torna o meio amarelo,

com ou sem produção de gás. Alcalino ou inalterado na superfície, com produção de H₂S.

A grande maioria das salmonelas não fermenta a sacarose e a lactose, não provocando alterações no meio TSI. Como a fonte de carbono utilizável (glucose) é rapidamente esgotada, *Salmonella* passa a degradar aerobiamente o substrato proteico do meio, produzindo amoníaco (NH₃), o que confere ao meio um pH alcalino, modificando a coloração da cunha de ágar para rosa intenso.

Descarboxilação da lisina

Inoculou-se, através de picada em profundidade e riscado em cunha de ágar LIA (Difco, Detroit, EUA) e incubou-se a 36°C por 24 a 30 horas. Após incubação, observou-se a descarboxilação da lisina pela alcalinização. Isto é revelado pela não alteração de cor do indicador presente.

Foi ainda inoculado um controlo, com caldo base para descarboxilação sem lisina, para comprovação da acidificação pela fermentação da glucose. Esse tubo permanecerá amarelo até o final do período de incubação. A maioria das salmonelas é capaz de produzir lisina descarboxilase. Quatro por cento das estirpes de *Salmonella* não descarboxilam a lisina.

Meio SIM (mobilidade) e Produção de Indol

Inoculou-se por picada o meio de cultura SIM (Difco, Detroit, EUA) e incubou-se a 36 °C por 24 a 30 horas. A mobilidade é caracterizada pela difusão do crescimento por todo o meio. Se for restrito à linha de inoculação, indica que o microrganismo é imóvel.

Após avaliação da mobilidade adicionam-se algumas gotas de reagente de Kovac's aos tubos para verificar se houve produção de indol. Se for positivo, há formação de um anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura, caso contrário o anel permanece amarelo, cor original do reagente de Kovac's.

A maioria das salmonelas apresenta mobilidade positiva. O meio SIM é o meio mais indicado para a verificação da produção de H₂S. A maioria das salmonelas produzem H₂S e são indol negativas.

2.2.2.3. Testes bioquímicos de confirmação

Após os testes preliminares, foram ainda realizadas algumas provas bioquímicas de confirmação.

Teste de urease

Transferiu-se uma ançada da cultura de TSI para um tubo de ensaio com caldo ureia Christensen e incubou-se a 35 °C durante 24 horas. Se o meio permanecer da cor original (pêssego) indica teste negativo. As maiores das estirpes de *Salmonella* são urease negativa.

Teste de citrato

Com a agulha de inoculação, transferiu-se o inóculo da cultura para um tubo de ágar citrato de Simmons (Difco, Detroit, EUA) inclinado, fazendo riscado na rampa e picada no fundo. Incubou-se 48 horas em estufa a 35 °C. O teste é positivo quando o meio deixa de ser verde (cor natural) e se torna azul. A maioria das estirpes de *Salmonella* spp. são citrato-positivas.

Teste de malonato

Incubou-se o caldo de malonato (Difco, Detroit, EUA) (inoculado com a cultura de TSI) a 35 °C por 48hs, incluindo um tubo não inoculado como controle. Observou-se a viragem alcalina do indicador, alterando a cor do meio verde para azul (teste positivo) ou permanência da cor verde do meio inalterado (teste negativo). A maioria das estirpes de *Salmonella* são malonato-negativas.

Teste da oxidase

Usando ança de platina, realizou-se a prova da oxidase, espalhando a cultura sobre tiras de papel para teste de oxidase. A leitura foi feita em 10 a 20 segundos. Após esse tempo, podem ocorrer reacções falso-positivas. O aparecimento de cor azul (N'N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina) ou vermelho intenso (oxalato de para-amino-dimetilanilina) é indicativo de reacção positiva. Todas as salmonelas apresentam reacção de oxidase negativa (ausência da aparência de cor).

Teste de vermelho de metilo e Voges-Proskauer (VM-VP)

Neste teste transferiu-se uma ançada do tubo de TSI para um tubo de ensaio com caldo VM-VP (Difco, Detroit, EUA) e incubou-se a 35 °C durante 24 horas.

Para a realização do VP, transferiu-se 1,0 mL da cultura (VM-VP) para um tubo estéril e adicionou-se 0,6 mL de solução de α - naftol 5% e agitou-se. Em seguida, adicionou-se 0,2 mL de solução KOH a 40%. O teste é positivo se ao fim de uma hora o meio ficar rosa ou vermelho.

Para a realização do teste VM incubou-se a cultura VM-VP por mais 48 horas, e transferiu-se 2,5 mL da cultura para um tubo estéril. Adicionou-se cinco gotas de solução de vermelho de metilo e observou-se o aparecimento da cor vermelha (positivo) ou amarela (negativo) no meio.

Grande parte das estirpes de *Salmonella* spp. são VM- positivas e VP- negativas, ou seja, para que o teste seja positivo para *Salmonella* spp. o tubo de VP não deve mudar de cor e o tubo de VM deve ficar vermelho ou rosa.

2.2.3. Pesquisa de *Listeria*

2.2.3.1. Cultura, Isolamento e Seleção

Pesou-se 25 g de queijo de coalho para um saco de Stomacher e adicionou-se 225 mL de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB) (Difco, Detroit, EUA). Homogeneizou-se por 2 minutos em Stomacher e incubou-se a 30°C por 24 horas. Após a incubação, transferiu-se 0,1 mL da cultura para tubo contendo 10 mL de caldo Fraser e acrescentou-se 0,1 mL de suplemento Fraser. Incubou-se a 30 °C por 24 a 48 horas. Na figura 5 está representada todas as etapas de pesquisa de *Listeria*.

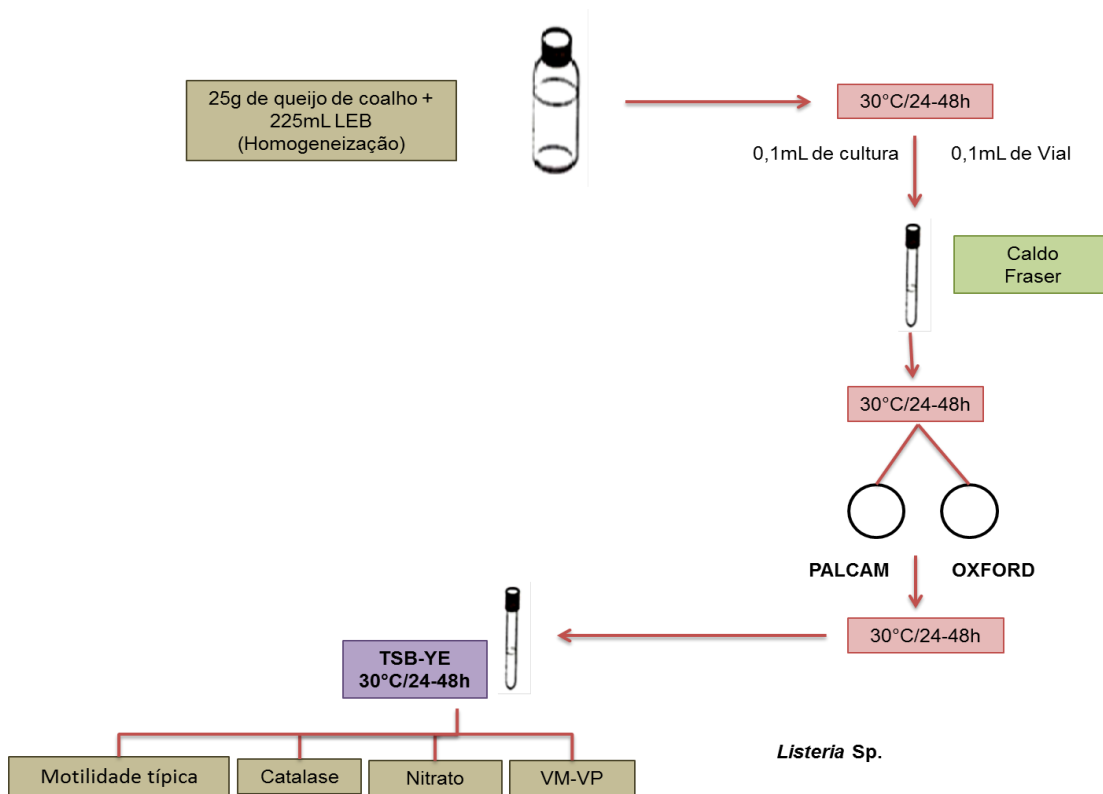


Figura 5: Esquematização das diferentes etapas de pesquisa de *Listeria*.

Fonte: Adaptado de Manual Analítico de Bacteriologia/FDA

As etapas seguintes só se realizaram quando o caldo Fraser se apresentou turvo ou negro após incubação (figura 6 A). Com uma ança de platina de 5 mm de diâmetro, repicou-se do caldo Fraser para placas contendo ágar Oxford (figura 6 B) e placas contendo ágar Palcam (figura 6 C) suplementado. Incubou-se as placas a 30 °C por 24 a 48 horas.

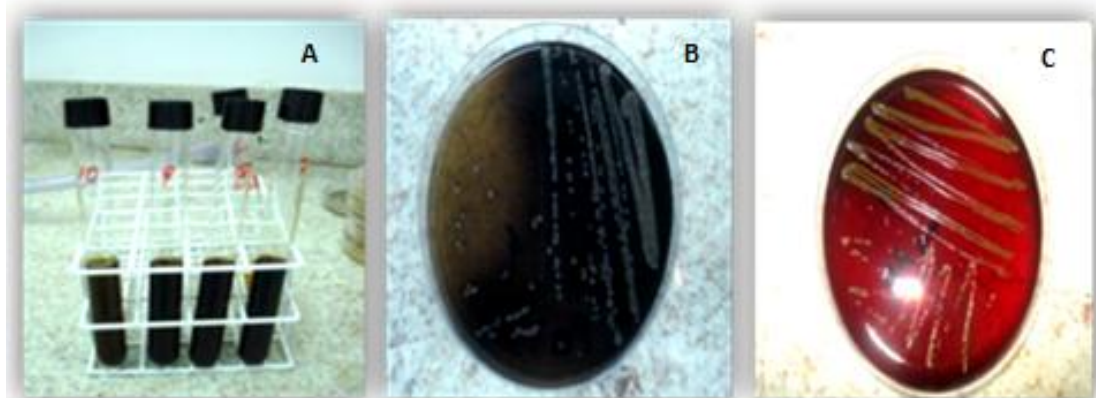


Figura 6: A) Caldo de Fraser turvo; B) colónias pretas rodeadas por halo escuro em ágar Oxford; C) colónias verde-acinzentadas, em ágar Palcam.

Fonte: Por Ângela Fonte

2.2.3.2. Confirmação da presença de *Listeria*

Seleccionaram-se três colónias típicas de cada placa, para confirmação. Inocularam-se as colónias à superfície em placas de ágar Tripticase de Soja (Difco, Detroit, EUA) suplementado com 0,6% de extracto de levedura (TSA-YE). Incubaram-se as placas a 30 °C durante 24-48 horas. Observaram-se as colónias sob luz oblíqua e seleccionou-se uma colónia típica, bem isolada, para a realização das provas de confirmação. Com uma ança, transferiu-se a colónia para um tubo de TSA-YE inclinado e um tubo de Caldo Tripticase de Soja 0,6% de extracto de levedura (TSB-YE). Incubaram-se os tubos a 30 °C/24h.

Teste de catálase

A partir dos tubos de TSA-YE, transferiu-se uma ançada da cultura para uma lâmina de microscopia, cobriu-se com uma gota de peróxido de hidrogénio (3%) e observou-se a ocorrência de borbulhamento imediato (teste positivo) ou não borbulhamento (teste negativo). As estirpes de *Listeria* são catalase positivas.

Teste de mobilidade

A partir dos tubos de TSB-YE, inoculou-se cada cultura suspeita em tubo de ágar Sulfeto Indol Mobilidade (SIM) (Difco, Detroit, EUA), por picada no centro do meio de cultura, até uma distância de 1 cm do fundo. Incubaram-se os tubos a 25 °C /7 dias e observaram-se diariamente. As estirpes de *Listeria* são móveis e desenvolvem uma zona de migração típica, espalhando-se na parte superior do meio e mantendo-se restritas à picada no fundo do tubo. Esse tipo de migração produz uma massa de crescimento característica, lembrando um guarda-chuva.

Teste do nitrato

A partir dos tubos de TSB-YE, inoculou-se uma ançada de cada cultura com inóculo denso, em tubos de caldo nitrato (Difco, Detroit, EUA) e incubou-se a 35 °C/5 dias. Após a incubação, adicionou-se aos tubos 0,25 mL de cada um dos reagentes para teste de nitrato (A= solução de ácido sulfanílico 0,8%, B = solução de α -naftol 0,5%). Observou-se o desenvolvimento de uma cor rósea avermelhada em 10 minutos no máximo (teste positivo). Quando negativo, ausência de aparecimento de cor, adicionou-se uma pitada de pó de zinco, deixou-se em repouso por 10 minutos e verificou-se se o meio se mantinha com a cor inalterada (teste positivo) ou adquiria uma coloração rósea avermelhada (teste negativo). As estirpes de *Listeria* não reduzem o nitrato.

Reacção em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI)

A partir dos tubos de TSB-YE, inoculou-se cada cultura em tubo de TSI, por picada e estrias na rampa. Incubaram-se os tubos a 35 °C /24 horas e observou-se se havia ocorrência de reacção típica de *Listeria*, isto é, rampa e fundo ácidos (amarelos), sem produção de H₂S (não-escurecimento do ágar).

2.2.4. Enumeração de *Staphylococcus coagulase positiva*

Pesou-se 25 g de queijo de coalho para um saco de plástico estéril, adicionou-se 225 mL de água peptonada tamponada (APT) e homogeneizou-se durante 2 min em Stomacher. Após a homogeneização, transferiu-se 1 mL da amostra para tubos contendo 9 mL de APT e prepararam-se as diluições (10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴).

Para a quantificação de *Staphylococcus coagulase positiva* utilizou-se o método de contagem através de inoculação por espalhamento à superfície de meio (*Spread-plate*) Ágar Baird Parker (BP) com telurito de potássio a 3,5% (Difco, Detroit, EUA), em triplicado, depositando-se 0,1 ml de cada diluição (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴) sobre a superfície do ágar e, com auxílio da ança, espalhou-se o inóculo por toda a superfície do meio até a completa absorção. Para a diluição 10⁻¹ depositou-se 0,3 mL em triplicado e uma outra placa com 0,1 mL. As placas foram incubadas, em estufa, a 37 °C, por 24 - 48 horas.

Foram seleccionadas placas que continham menos de 300 colónias para contagem. Com as colónias típicas e algumas atípicas (sem halo) realizaram-se provas bioquímicas. Seleccionaram-se várias colónias típicas de cada placa e inocularam-se em tubos contendo Caldo Infusão cérebro Coração (BHI) (Difco, Detroit, EUA), os quais foram incubados a 37 °C por 24 horas. A partir do cultivo crescido em BHI, foi realizada a prova bioquímica confirmativa de coagulase em tubo. Após confirmação os isolados foram crescidos em TSA a 37°C (Figura 7 b), e armazenados sob refrigeração. Na figura 9 está resumida a metodologia de pesquisa e enumeração de *S. aureus*.

Foram apenas utilizadas para contagem, colónias típicas de *S. aureus*, isto é, colónias circulares pretas ou cinza escuro, com 2-3 mm de diâmetro, lisas, convexas, com bordos perfeitos e rodeados por uma zona opaca e ou um halo transparente. Na figura 7A estão representadas as colónias típicas de *S.aureus*.

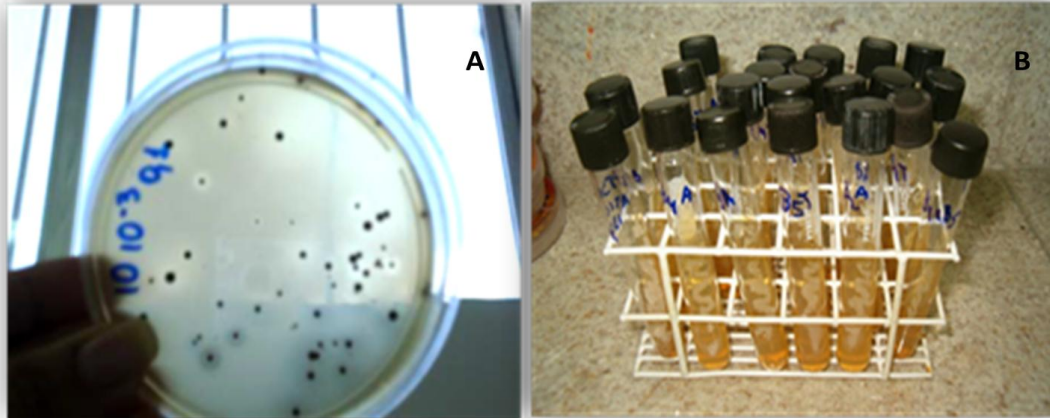


Figura 7: A) Colónias típicas de *S.aureus*; B) Isolados de *S.aureus* em meio TSA

Fonte: Por Ângela Fonte

2.3. Pesquisa e Contagem de *Staphylococcus aureus*

A pesquisa prévia dos isolados de *Staphylococcus* foi realizada com base em testes bioquímicos convencionais descritos no Manual Analítico de Bacteriologia/FDA. Testes como coloração de Gram e teste da termonuclease nem sempre foi possível serem realizados devido à falta de financiamento.

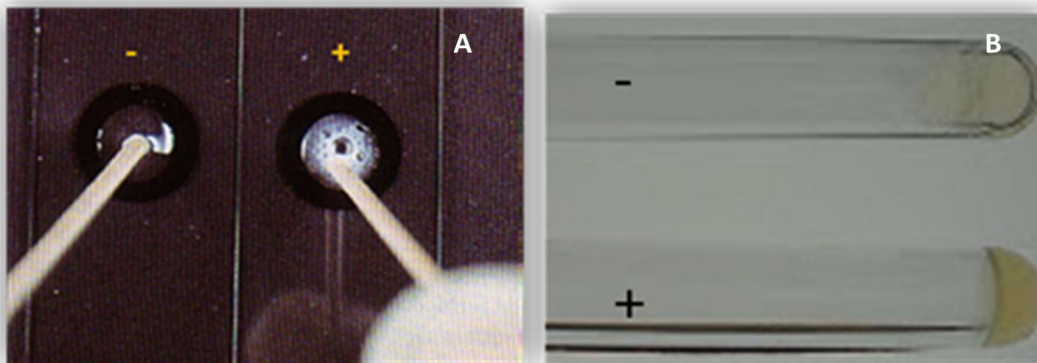


Figura 8: A) Prova da catalase; B) Prova da Coagulase

Fonte: 8A- <http://dc197.4shared.com/doc/VEV8TNOZ/>; 8B- <http://microbiologiabrasil.blogspot.com>

2.3.1. Prova da catalase

A partir dos tubos de TSA-YE (Difco, Detroit, EUA), transferiu-se uma ançada da cultura para uma lâmina de microscopia, cobriu-se com uma gota de peróxido de hidrogénio 3% e observou-se a ocorrência de borbulhamento imediato (teste positivo) ou não borbulhamento (teste negativo). As estirpes de *S. aureus* são catalase positiva.

2.3.2. Prova da coagulase

A partir de tubos de caldo BHI com crescimento pipetou-se 0,2 mL para tubos de ensaio estéreis e adicionou-se 0,5 mL de Coagulase Plasma-EDTA (Laborclin, Pinhais, Brasil). A mistura foi feita com movimentos de rotação. Incubou-se a 35 °C durante aproximadamente 6 h. Consideram-se positivos para *S. aureus*, todos os coágulos firmes que não se romperam quando inclinados. Na figura 8 estão representadas ambas as provas.

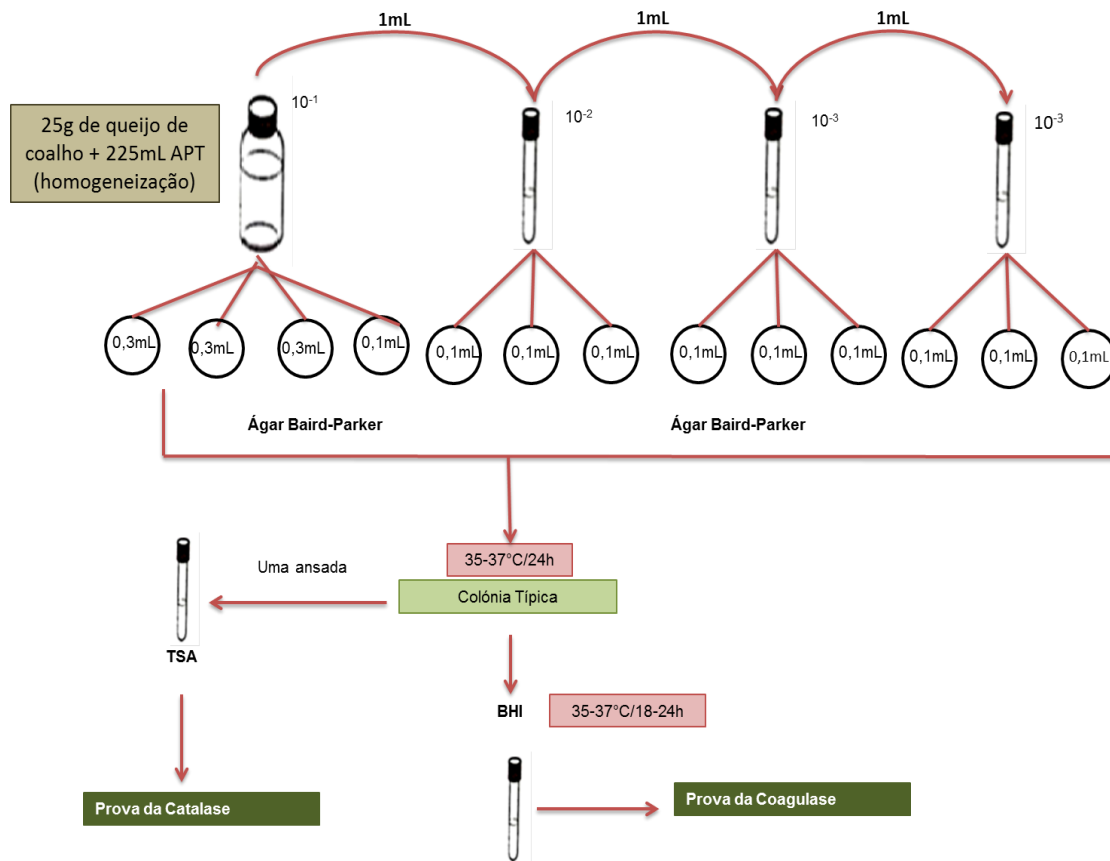


Figura 9: Esquematização da metodologia de enumeração de *S. aureus*

Fonte: Adaptado de Manual Analítico de Bacteriologia/FDA.

2.4. Extracção de DNA Genómico

O DNA genómico das estirpes de *S. aureus* estudadas foi extraído segundo protocolo descrito por Hesselbarth e Schwarz (1995) com algumas modificações:

Para a extracção do DNA foi utilizada uma colónia de cada isolado, crescida em 4mL caldo BHI a 35 °C por 15-18 horas. 1 mL de cultura foi transferido para um microtubo e centrifugada (Mikro 200/ Mikro 200R; Andreas Hettich GmbH&Co. KG, Futtigen-Germany) a 14.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido com 500 µL de TE (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) e EDTA 1 mM (pH 8,0)) juntamente com 10 µL de Lisozima (10 mg/mL) (Sigma, L 7386) e 10 µL de proteinase K (20 mg/ml) (Sigma, P6556), para lise da parede celular. A suspensão foi incubada a 60 °C por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 100 µL de tampão STE (SDS 2,5%, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 0,25 M) e incubada por 15 minutos a 60 °C, 5 minutos à temperatura ambiente e 5 minutos no gelo.

A reacção foi neutralizada com 130 µL de acetato de amónio a 7,5 M, mantida no gelo por 15min e centrifugada por 5 min a 14.000 g. Aproximadamente 700 µL de sobrenadante foi transferido para outro microtubo e misturados com o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (25:24:1), a mistura foi centrifugada a 14.000g por 5min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo microtubo, e o DNA precipitado com 420 µL de isopropanol a -20 °C por 60 horas. Após centrifugação a 14000 g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e os microtubos invertidos. O precipitado foi ressuspendido em 50 µL de água deionizada estéril e mantido sob refrigeração.

2.5. Detecção dos Genes Enterotoxigénicos por PCR

2.5.1. Primers

No quadro 8, estão indicados os cinco *primers* utilizados na PCR assim como algumas características correspondentes. Os *primers* utilizados foram sintetizados pela empresa Invitrogen.

Quadro 8: *Primers* utilizados na detecção de genes toxigênicos por PCR.

Nome do <i>Primer</i>	Tamanho do amplicon (pb)	Sequência (5'→3')
SEA-3b SEA-4b	127	CCTTTGGAAACGGTTAAAACG TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC
SEB-1c SEB-4b	477	TCGCATCAAACCTGACAAACG GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC
SEC-3b SEC-4b	271	CTCAAGAACTAGACATAAAAGCTAGG TCAAAATCGGATTAACATTATCC
SED-3B SED-4B	319	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC
SEE-3B SEE-4B	178	CAGTACCTATAGATAAAAGTTAAAACAAGC TAACTTACCGTGGACCCTTC

Fonte: Adaptado de Invitrogen, 2011.

2.5.2. Mistura de amplificação

A composição da mistura da amplificação e as respectivas quantidades encontram-se assinaladas no quadro 9. Todos os componentes foram adquiridos pela Invitrogen Life Technologies, (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

Quadro 9: Composição da mistura de amplificação

Componentes	Concentração da solução de trabalho	Concentração final	Volume (µL)
Tampão	10 x	1 x	2,5
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75
dNTP mix	10 mM	0,2 mM	0,5
Primer 1	10 µM	0,5 µM	1,25
Primer 2	10 µM	0,5 µM	1,25
Taq DNA polimerase	5 U/µL	1 U/µL	0,2
DNA	-	-	5
Água Milli-Q	Qb	Qb	13,55
		Total	25µL

2.5.3. Controlos

Foram utilizadas como controlos positivos, estirpes enterotoxigénicas padrão de *S. aureus* pertencentes à *American Type Culture Collection* (ATCC). No quadro 10 estão indicados os nomes das estirpes e os genes codificadores das diferentes toxinas. O controlo negativo foi também incluído, em que DNA molde foi omitido e substituído por água.

Quadro 10: Estirpes de referência e respectivos genes codificadores

Nome da estirpe referência	Genes codificadores
ATCC 13565	<i>Sea</i>
ATCC 14458	<i>Seb</i>
ATCC19095	<i>sec, seh, seg, sei</i>
ATCC 23235	<i>sed, seg, sei, sej</i>
ATCC 27664	<i>See</i>

2.5.4. Condições do Termociclador

Os microtubos de PCR (0,2 mL, AXYGEN-Quality, Curitiba, Brasil), com a mistura de amplificação mencionada no quadro 9 foram colocados no termociclador (Biocycler Termocicladores, São Paulo, Brasil) (hot lid a 121°C). Após a amplificação, os microtubos permaneceram no termociclador a 4°C até ao momento de aplicar os produtos amplificados no gel de agarose.

Na figura 10 estão representadas as condições experimentais da reacção de amplificação.

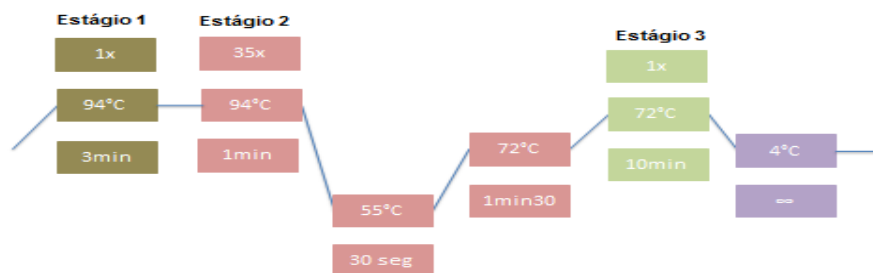


Figura 10: Programa do termociclador utilizado na PCR para detecção de genes enterotoxigénicos.

Fonte: Por Ângela Fonte

2.5.5. Electroforese em gel de Agarose

Terminada a reacção de amplificação do DNA, misturaram-se 20 µL de produto amplificado (amostra) com 5 µL de *gel loading* 6x (Sigma, G7654- Tipo I, São Paulo, Brasil). O *gel loading* é usado com dois propósitos: funcionar como agente espessante, evitando o refluxo da amostra de DNA ao ser aplicada no poço do gel e funcionar como corante, permitindo o acompanhamento da frente de corrida.

Os produtos de PCR de cada amostra foram separados por electroforese em gel de agarose (Difco, Detroit, EUA) a 1,8% (m/v) em tampão TAE 1x (Tris 1 M (pH 8,0), EDTA 0,5 M (pH 8,0)) durante 85 min a 80 V. Foi ainda utilizado como marcador molecular, o marcador 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, São Paulo, Brasil) (Anexo 2). No Anexo 3 estão descritos também os procedimentos de preparação das várias soluções de trabalho.

As amostras de DNA carregadas negativamente, devido à presença de grupos fosfatos, ao serem submetidas a um campo eléctrico migram em direcção ao ânodo, ou seja ao polo positivo. A concentração do gel de agarose desempenha um papel importante na resolução obtida, funcionando como uma peneira, isto é determina o tamanho das moléculas que são separadas. As moléculas de igual tamanho migram uniformemente, formando bandas que serão posteriormente visualizadas com o auxílio do corante brometo de etídeo. O brometo de etídeo intercala-se nas moléculas de DNA emitindo fluorescência quando excitado com luz ultravioleta.

2.5.6. Aquisição da imagem do gel

Finalizada a corrida electroforética, o gel é imerso numa solução de brometo etídeo, durante cerca de 20 minutos em agitação constante. A remoção de excesso de corante foi feita em 200ml de água Milli-Q. A visualização e aquisição da fotografia do gel foram realizadas com o auxílio de um transluminador (Major Science UVDI-110/220, Curitiba, Brasil).

3. Resultados e Discussão

Os surtos provocados por *S. aureus* estão relacionados, na sua maioria, à presença de toxinas nos alimentos envolvidos. Dessa forma, a pesquisa de enterotoxinas nos alimentos contribui para elucidação dos surtos. A pesquisa de enterotoxinas requer métodos imunológicos, com limite de detecção entre 1 e 2 ng/g de alimento, os quais exigem elevada purificação de antígenos e anticorpos, resultando em elevado custo de produção (Kamogae *et al.*, 1998). Estão também disponíveis no mercado, testes comerciais, porém o elevado custo limita a divulgação do seu uso no controle de qualidade, principalmente, pelo Sistema Público de Vigilância em Saúde. Como alternativa, é possível conduzir a análise de enterotoxinas, através do estudo dos respectivos genes codificadores em estirpes isoladas de alimentos implicados nos surtos, e associar a esta informação as contagens de *S. aureus* no alimento. Esta associação permite inferir sobre o risco da presença da toxina no alimento e concluir sobre a etiologia do surto.

Assim sendo, o trabalho experimental aqui apresentado foi dividido em duas partes. Na primeira parte, foram realizadas várias análises microbiológicas aos principais patogénios presentes no queijo de coalho, sendo esta análise orientada pelos parâmetros e limites exigidos pela legislação Brasileira. Na segunda parte do estudo, foram realizados vários PCR's, para pesquisar a presença de genes enterotoxigénicos (*see a see*).

3.1. Avaliação Microbiológica de amostras de queijo de coalho

Relativamente à avaliação microbiológica do queijo de coalho, foram pesquisadas sete amostras de queijo de coalho provenientes do sertão Alagoano. Os resultados obtidos irão pertencer a um trabalho, já previamente iniciado pelo laboratório, sobre Qualidade e Segurança de queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Alagoas.

A análise das várias amostras foi realizada ao longo dos cinco meses, dependendo do fornecimento por parte da CPLA. No quadro 11 e 12 estão resumidos os resultados das análises microbiológicas relativas a sete amostras de queijo de coalho. No capítulo dos anexos estão apresentados, detalhadamente, os resultados conseguidos para os testes preliminares e bioquímicos.

Quadro 11: Avaliação microbiológica das sete amostras queijo de coalho do sertão Alagoano

Amostra	<i>Staphylococcus coagulase (+)</i> (UFC/g)	Coliformes Totais (NMP/g)	Coliformes Fecais (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>
Queijo A	8,4x10 ⁴	>110	15x10 ²	Presença	Ausência
Queijo B	1,1x10 ⁵	>110	21x10 ²	Presença	Ausência
Queijo C	4,8x10 ⁵	>110	29x10 ²	Ausência	Ausência
Queijo D	2,0x10 ⁵	>110	29x10 ²	Ausência	Ausência
Queijo E	1,7x10 ⁶	>110	>110	Ausência	Presença
Queijo F	1,4x10 ⁶	>110	>110	Ausência	Ausência
Queijo G	1,5x10 ⁶	>110	>110	Presença	Ausência

Quadro 12: Avaliação microbiológica de queijo de coalho do sertão Alagoano

Microrganismo	Contagens ¹	Nº de amostras	%
Coliformes totais (NMP/g)	<5000	0	0
	5000-10000	0	0
	>10000	7	100
Coliformes fecais (NMP/g)	<1000	0	0
	1000-5000	4	57,1
	>5000	3	42,9
<i>Staphylococcus coagulase (+)</i> (UFC/g)	<10 ³	0	0
	10 ³ -10 ⁷	7	100
<i>Salmonella</i> spp. (em 25g)	Ausência	4	57,1
	Presença	3	42,9
<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25g)	Ausência	6	85,7
	Presença	1	14,3

1- Limites de acordo com a legislação Brasileira (Anônimo, 1996)

A enumeração de coliformes é utilizada como indicador de higiene e contaminação após o processamento. Estes testes apresentam problemas nomeadamente pela variabilidade da definição do termo “coliformes” e pelo facto de apenas detectarem organismos fermentadores de lactose. Na Europa esta análise foi substituída pela contagem de *Escherichia coli*.

Os resultados obtidos para a enumeração de coliformes totais e fecais estão apresentados nos quadros 11 e 12 e no Anexo 4. Todas as amostras de queijo de coalho apresentaram coliformes totais, dos quais apenas 57,1% continham coliformes fecais, entre 1x10³ e 5x10³ NMP/g. É relevante sobressair que em 42,9% das amostras, os números de coliformes fecais se encontravam fora dos limites estabelecidos pela legislação brasileira (m=1x10³ e M=5x10³), indicando alto nível de contaminação fecal, o que pode ser atribuído à má qualidade da matéria-prima ou às insuficientes condições de processamento dos queijos. Os valores obtidos assemelham-se a resultados obtidos noutros estudos. Em Santana *et al* (2008), 93,3%

dos queijos analisados estavam impróprios para comercialização e consumo. Já em Rocha *et al.* (2006), constatou-se que 61% do queijo-de-minas frescal, comercializado em supermercados em São Paulo, apresentava contagens superiores aos limites.

Alusivamente à presença de *Salmonella* spp., todas as placas de XLD, apresentavam colônias características de *Salmonella* (colônias cor-de-rosa escuro com centro preto). Contudo, após testes complementares (Anexo 5), constatou-se que apenas 42,9% das amostras (A; B e G) continham *Salmonella* spp.. A presença de *Salmonella* em queijo de coalho e queijo tipo frescal também tem sido relatada em outras pesquisas. Em Santana *et al.* (2008), detectaram-se estirpes de *Salmonella* spp. em 26,7% das amostras de queijo de coalho comercializadas em Aracajú (SE) e em Feitosa *et al.* (2003), foram detectadas em 9% das amostras. A legislação Brasileira, bem como a Europeia, recomenda a ausência de *Salmonella* spp. em todos os alimentos para venda e consumo. *Salmonella* mantém-se viável em queijo contaminado durante longo período de tempo, o que ressalta a importância de controle de qualidade destes produtos.

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram positiva não esporulada, que provoca doença em humanos, a listeriose. Este agente patogénico é motivo de grande preocupação, nas empresas que produzem alimentos, devido às suas características fisiológicas, como a resistência a ambientes ácidos e com cloreto de sódio, a capacidade de crescer a baixas temperaturas e de criar biofilmes, o que lhe permite persistir e/ou recontaminar produtos alimentares. Apesar da listeriose poder ocorrer em adultos saudáveis, a maioria dos casos (80%) ocorrem em pessoas imunocomprometidas, grávidas, recém-nascidos e idosos (Jay, 1996).

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho, não é muito usual, devido à baixa notificação de casos de listeriose, nos estados do Nordeste. A legislação Brasileira não admite a presença de *Listeria monocytogenes* em alimentos para venda e consumo. Em 14,28% das amostras analisadas, foi detectado *Listeria monocytogenes*. Sousa *et al.* (2002), também observou *Listeria monocytogenes* em 17,1% das amostras de queijo de coalho artesanal comercializados em Fortaleza-CE. A presença de microrganismos potencialmente patogénicos em queijos deste tipo é indicativo da ineficiência do processamento térmico, do incumprimento de boas práticas de higiene e da existência de contaminações cruzadas. Os resultados relativos aos testes bioquímicos estão apresentados no Anexo 6.

A ocorrência de *S. aureus* foi observada em todas as amostras de queijo de coalho analisadas neste trabalho (quadro 12), com contagens variando entre $8,4 \times 10^4$ e $1,7 \times 10^6$. Estes valores são considerados altos e acima do limite permitido pela legislação ($m=100$ e $M=1000$). Todas as amostras foram classificadas como produtos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias.

A presença destas bactérias em mastites bovinas, a sua ubiquidade na natureza e o baixo nível sócio-económico dos ordenhadores, muitas vezes possuidores de maus hábitos de higiene, promovem a contaminação dos queijos, levando-os a níveis de contaminação superiores a 10^5 . No Anexo 7 estão apresentados das contagens de *S. aureus*.

Das sete amostras em estudo foram seleccionadas 70 colónias de *Staphylococcus* de meio selectivo, Ágar Baird-Parker, para isolamento e enumeração de *S. aureus*, e testadas quanto à produção das enzimas catalase e coagulase. Estas 70 colónias permitiram ainda estudar a relação entre a morfologia e capacidade de produção de coagulase; considerando-se colónias típicas, todas as que eram negras, brilhantes, bem delimitadas e com halos e colónias atípicas, colónias pequenas, negras, brilhantes e sem halo.

Destes 70 isolados, 71,4% produziram a enzima catalase e 65,7% produziram a enzima coagulase. Em relação à morfologia, dos 70 isolados, 43 (61,42%) eram colónias típicas de *S. aureus* e 27 (38,6%) colónias atípicas.

Referente à relação entre a morfologia e a produção de enzima, das 43 colónias típicas, 28 (65,12%) produziram coagulase e das 27 colónias atípicas 18 (66,7%) colónias produziram a enzima. Pode-se constatar através destes resultados, que apesar de todas as amostras apresentarem na sua maioria colónias típicas, 66,7% das colónias atípicas são coagulase positiva. Assim sendo, importa reconsiderar, que colónias crescidas neste ágar, específico para estirpes *S. aureus*, possam estar associadas a surtos de intoxicação estafilocócica uma vez que existe uma relação estreita entre a capacidade do microrganismo produzir a coagulase e de sintetizar a enterotoxina.

De uma forma geral, o maior problema relacionado com os elevados níveis de contaminação bacteriana encontrados neste tipo de queijo, reside na falta de saneamento e na má qualidade do leite cru. Apesar das entidades fiscalizadoras Brasileiras estarem a sofrer uma grande reforma, existe ainda a necessidade de se criarem novas entidades de vigilância, tanto nacionais como estaduais, de forma a controlar a qualidade da matéria-prima, a eficiência da pasteurização do leite e se esta é realmente efectuada. Como grande parte do fabrico do queijo é manual, deveria ainda existir um controlo das práticas de higiene bem como das condições de saúde dos manipuladores.

3.2. Detecção dos Genes Enterotoxigenicos por PCR

A segunda parte do trabalho focou-se na detecção de genes enterotoxigénicos (*sea a see*) em isolados de *S. aureus* de queijo de coalho (Anexo 8), pela técnica PCR. 85,7% das amostras em estudo continham contagens de *Staphylococcus* spp. superiores a 10^5 UFC/g, o que propicia à produção de enterotoxinas estafilocócicas.

Este trabalho exigiu várias modificações nos diversos protocolos, principalmente nos protocolos de extracção do DNA genómico. Antes da escolha pelo protocolo de extracção com proteinase K e lisozima, foram testados outros protocolos de extracção com fenol/clorofórmio (Kalia *et al.*,1999; Giraffa *et al.*, 2000), lisostafina e fenol/clorofórmio (Johnsom *et al.*,1991) e com fenol e proteinase K. Constatou-se que a sensibilidade da PCR para a detecção de genes de *S. aureus* em amostras de queijo de coalho é influenciada pelo método de extracção de DNA empregue e que o método da lisozima/proteinase K foi o mais sensível.

A optimização das condições de amplificação foi determinada com ajustes na concentração de $MgCl_2$, ajustes na temperatura e número de ciclos de emparelhamento. Antes da utilização dos *primers*, para a detecção da distribuição dos genes enterotoxigénicos nas várias amostras, assegurou-se a especificidade das estirpes de referência (controlos positivos) com os pares de *primers* concebidos para cada um dos genes em estudo. No quadro 13, encontram-se apresentados os resultados.

Quadro 13: Especificidade dos controlos positivos com os *Primers*

Estirpes de referência (Controlos Positivos)	Pares de <i>Primers</i>				
	SEA-3b/ SEA-4b	SEB-3b/ SEB-4b	SEC-3b/ SEC-4b	SED-3b/ SED-4b	SEE-3b/ SEE-4b
ATCC 13565	+	-	-	-	-
ATCC 14458	-	+	-	-	-
ATCC 19095	-	-	+	-	-
ATCC 23235	-	-	-	+	-
ATCC 27664	-	-	-	-	+

Os *primers* concebidos para a PCR, geraram produtos com as massas moleculares esperadas para os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*, isto é, 127 pb, 477 pb, 271 pb, 319 pb e 178 pb respectivamente.

Distribuição de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas

As estirpes enterotoxigénicas de *S. aureus* apresentaram diferentes conteúdos em genes codificadores de enterotoxinas. Neste trabalho, apenas foram pesquisados os genes codificadores de enterotoxinas clássicas, uma vez que são responsáveis por 95% dos casos de intoxicação estafilocócica em humanos (Cha *et al.*, 2006). Contudo, pesquisas feitas nos estados vizinhos a AL ao mesmo tipo de produto, revelaram percentagens mais elevadas de genes *sel* (Staphylococcal enterotoxin-like) do que os genes *se* clássicos (Nashev *et al.*, 2007; Luz, 2008). A presença dos genes *se* nos isolados de *S. aureus* encontra-se apresentada no quadro 14.

Dos 70 isolados, 48 apresentaram comportamento de estirpes *S. aureus*, contudo apenas 40 desses isolados foram utilizados para detecção de genes enterotoxigénicos. Todos os isolados de *S. aureus* examinados, continham um ou mais genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas, e a variabilidade de genótipos foi tão grande que foram subdivididos em 4 grupos de acordo com o número de genes (quadro 14). Estirpes de *S. aureus* com padrões de enterotoxinas diversificados têm sido frequentemente reportados (Mac Lauchlin *et al.*, 2000; Omoe *et al.*, 2002; Rosec e Gigaud, 2002). Dezasseis estirpes possuíam apenas um gene (4 *sea*, 4 *seb*, 2 *sec*, 3 *sed* e 3 *see*), enquanto que as restantes 24 estirpes, possuíam mais de um gene codificador. A percentagem dos genes codificadores de enterotoxinas clássicas é aumentada quando o isolado possui combinados de genes (figura 11). Este facto corrobora, um estudo levado a cabo no Japão (Omoe *et al.*, 2005).

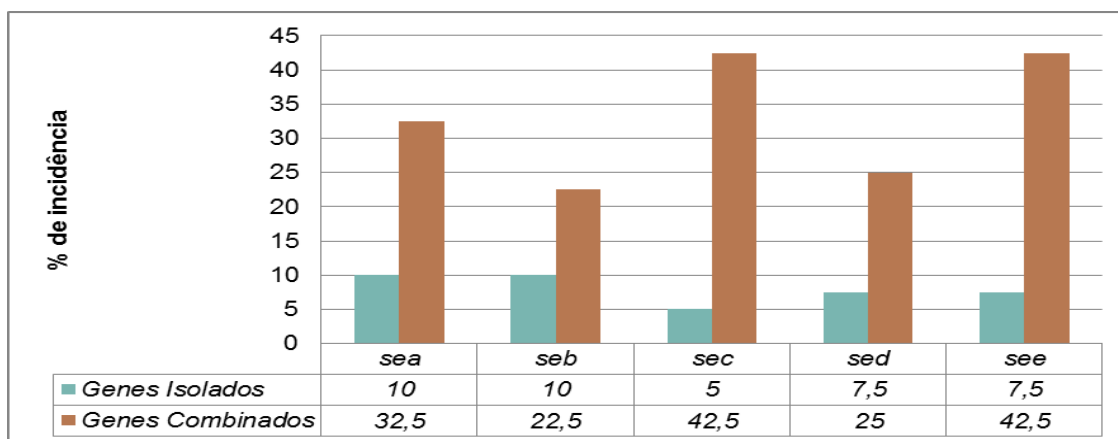


Figura 11: Incidência de genes clássicos isolados, ou combinados.

Os genes mais amplificados neste estudo foram *sec* (42,5%), *see* (42,5%), seguidos dos genes *sea*, *sed* e por último o gene *seb*. Estes resultados assemelham-se aos valores obtidos por Zocche *et al.* (2008) onde foram encontrados com menor ocorrência os genes *seb* e *sed*. A presença do gene *sea* foi surpreendente elevada (32,5%), considerando o histórico da presença deste gene em produtos lácteos. Em Oh *et al.* (2007) este estava presente em 18,8% dos isolados e em Cha *et al.* (2006) apenas em 15,4% das estirpes. Na figura 12 estão apresentados três fotografias correspondentes aos produtos de amplificação resultantes de três PCR diferentes.

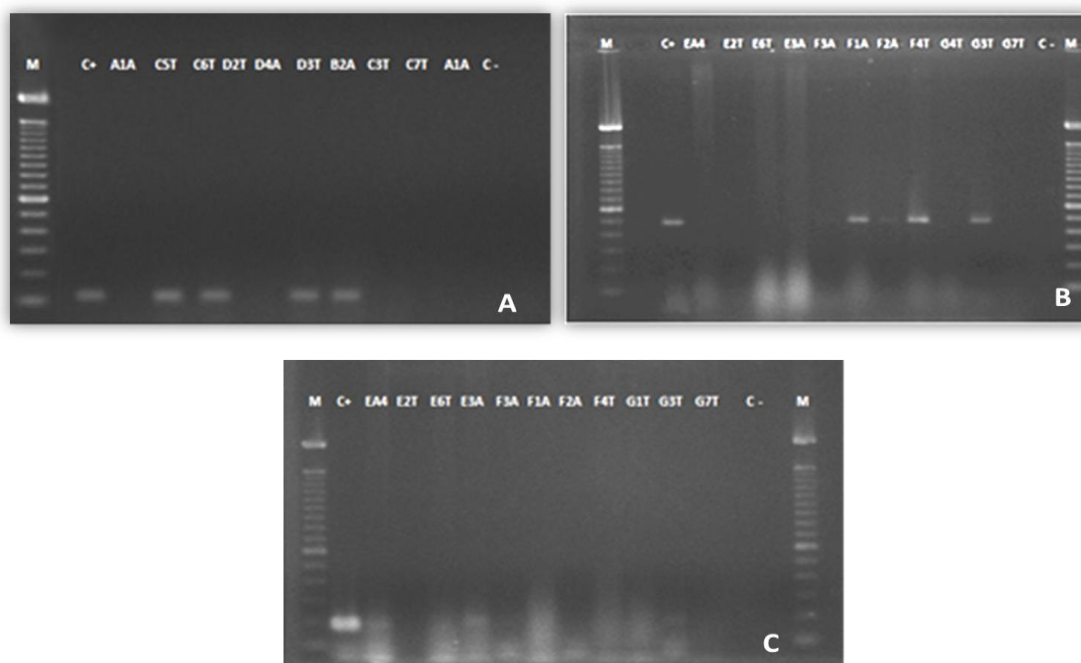


Figura 12: Resultados obtidos em diferentes PCR

A) Resultados da amplificação de isolados de *S.aureus* com o par de primers SEA-3b/SEA-4b; M- 100bp DNA ladder; Controlo Positivo- ATCC13565 (127pb). B) Resultados da amplificação de isolados de *S.aureus* com o par de primers SEB-3b/SEB-4b; M- 100bp DNA ladder; Controlo Positivo- ATCC 14458 (477pb). C) Resultados da amplificação de isolados de *S.aureus* com o par de primers SEE-3b/SEE-4b; M- 100bp DNA ladder; Controlo Positivo- 27664 (178pb).

No presente estudo, 60% dos genótipos obtidos, correspondiam a combinações de genes. As associações *sec+see* (30%), *sea+sec* (15%), *sea+see* (12,5%) e a *seb+sec* (12,5%), foram as mais frequentes. Genótipos com mais de dois genes também foram observados, *sea+sec+see* e *seb+sec+see* igualmente em 7,5% dos isolados estudados. As combinações de quatro genes só estiveram presentes em 2,5% dos isolados.

Morfologia das colónias e produção de genes de SE's

Em relação à morfologia dos isolados, verificou-se que 64,7% das colónias atípicas, possuíam mais do que um gene codificador de enterotoxinas, valor superior aos isolados das colónias típicas, que têm na sua grande maioria genótipos de um único gene. Este facto vem fortalecer a hipótese, já mencionada anteriormente; colónias atípicas crescidas em meio Baird-Parker, específico para *S. aureus*, devem ser tomadas em conta, quando pesquisados os agentes etiológicos de uma intoxicação alimentar.

A relação estreita entre a capacidade de produzir a enzima coagulase e a síntese de enterotoxinas foi evidenciada neste estudo, provando que colónias atípicas têm perfis mais enterotoxigénicos que colónias típicas. Em Santana *et al.* (2008), é também evidenciada a relação entre a morfologia das colónias e os perfis enterotoxigénicos.

Quadro 14: Genótipos obtidos para as sete amostras em estudo.

	Genes Enterotoxigénicos	Amostra A (n=7)		Amostra B (n=8)		Amostra C (n=8)		Amostra D (n=4)		Amostra E (n=4)		Amostra F (n=5)		Amostra G (n=4)		Total (n=40)	
			%		%		%		%		%		%		%		%
Toxinas Clássicas (isolados)	<i>sea</i>	1	42,9	5	62,5	3	37,5	1	25	-	-	1	20	-	-	13	32,5
	<i>seb</i>	1	14,3	-	-	-	-	-	-	1	25	4	80	3	75	9	22,5
	<i>sec</i>	5	71,4	4	50	1	12,5	-	-	2	50	2	40	3	75	17	42,5
	<i>sed</i>	3	42,9	4	50	2	25	1	25	-	-	-	-	-	-	10	25
	<i>see</i>	3	42,9	6	75	1	12,5	1	25	2	50	2	40	2	50	17	42,5
Combinações de dois genes	<i>sea,seb</i>	1	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2,5
	<i>sea,sec</i>	2	28,6	2	25	1	12,5	-	-	-	-	1	20	-	-	6	15
	<i>sea,sed</i>	2	28,6	2	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	10
	<i>sea,see</i>	1	14,3	3	37,5	1	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	5	12,5
	<i>seb,sec</i>	1	14,3	-	-	-	-	-	-	1	25	1	20	2	50	5	12,5
	<i>seb,sed</i>	1	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2,5
	<i>seb,see</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	25	1	20	1	25	3	7,5
	<i>sec,sed</i>	3	42,9	1	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	10
	<i>sec,see</i>	2	28,6	3	37,5	1	12,5	-	-	2	50	2	40	2	50	12	30
	<i>sed,see</i>	1	14,3	3	37,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	10
Combinações de três genes	<i>sea,seb,sec</i>	1	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2,5
	<i>sea,seb,sed</i>	1	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2,5
	<i>sea,seb,see</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>sea,sec,sed</i>	2	28,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	5
	<i>sea,sec,see</i>	-	-	1	12,5	1	12,5	-	-	-	-	1	20	-	-	3	7,5
	<i>sea,sed,see</i>	1	14,3	1	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	5
	<i>seb,sec,sed</i>	1	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2,5
	<i>seb,sec,see</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	25	1	20	1	25	3	7,5
	<i>sec,sed,see</i>	1	14,3	1	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	5
Combinações de mais de três genes	<i>sea,seb,sec,sed</i>	1	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2,5
	<i>sea,sec,sed,see</i>	1	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2,5
	<i>sea,seb,sec,sed,see</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Na figura 13 estão representadas as percentagens dos genótipos referentes a isolados de colónias típicas e de colónias atípicas.

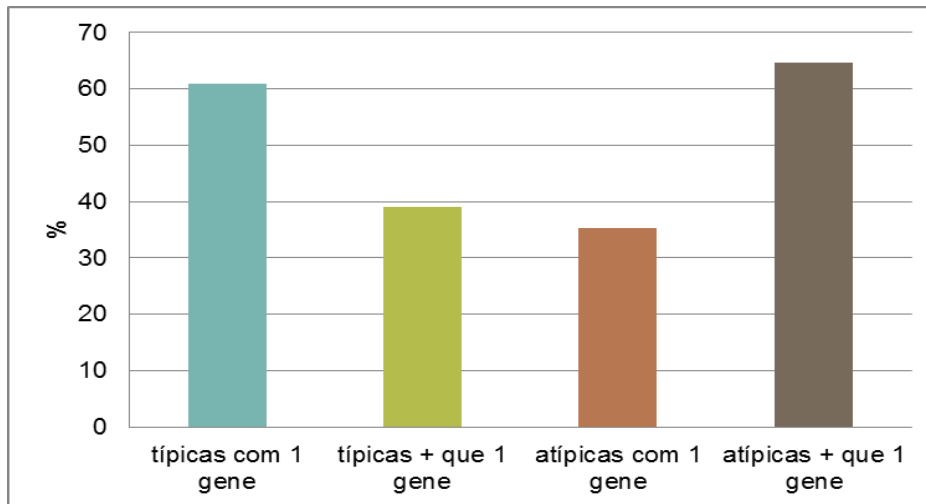


Figura 13: Relação entre a morfologia e a presença de um ou vários genes.

Relação entre a fonte de contaminação e o tipo de SE

Diversos estudos têm demonstrado a relação entre a fonte de contaminação e o tipo de SE produzida por *S. aureus*. SEA e SEB são associadas a contaminações de origem humana, isto é, contaminações cruzadas durante e após processamento, (Adesiyun *et al.*, 1998; Fueyo *et al.*, 2005), enquanto SEC e SED, estão relacionadas com contaminações proveniente de animais bovinos e suínos respectivamente (Tollersrud *et al.*, 2000; Stephan *et al.*, 2001; Nájera-Sánchez *et al.*, 2003; Jorgensen *et al.*, 2005). Esta informação permite inferir a provável fonte de contaminação de um determinado alimento.

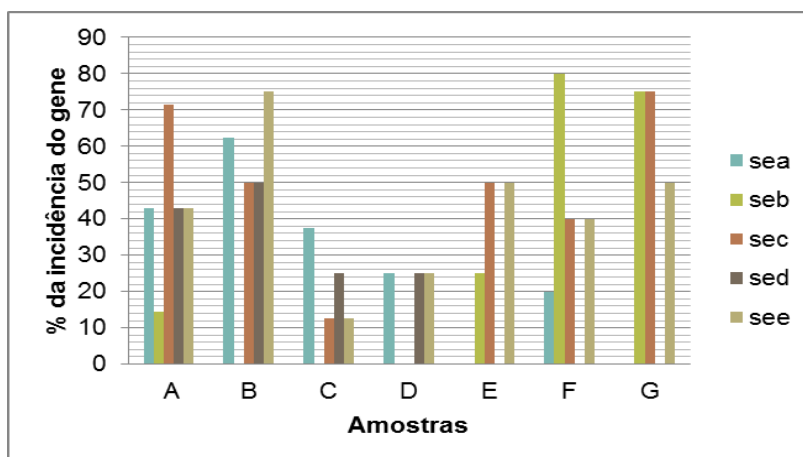


Figura 14: Génotipos obtidos nas diferentes amostras em estudo.

Pela análise da figura 14, podemos verificar que as amostras A e B apresentam genótipos mais diversificados, e que as amostras A, B, F e G percentagens maiores de amplificadas. Tendo em conta a informação anterior podemos então constatar, que as amostras B, F e G, provavelmente, sofreram contaminações de origem humana, ou seja contaminação por parte ou dos ordenhadores, pela falta de hábitos de higiene, ou por contaminações cruzadas durante o processamento e/ou distribuição do produto. Já as amostras A, B, E e G, pareciam apresentar contaminação de origem bovina, este facto pode estar relacionado com a má qualidade da matéria-prima, ou seja, o leite ser proveniente de animais com mastites.

As amostras A, F, G são provenientes de pequenos mercados de povoados do interior de Alagoas. Estes queijos são elaborados em quantidades consideráveis, a partir de leite hipoteticamente pasteurizado, sem os devidos cuidados de higiene, comercializados em locais que não reúnem requisitos mínimos de acondicionamento e onde a vigilância na maioria das vezes não chega. Todos estes factores são marcantes na qualidade do queijo. Outro factor que poderá justificar os índices elevados de contaminação é a possibilidade de fraude nas embalagens, isto é, visto que a venda ao público de queijo de coalho produzido com leite cru é interdita pela legislação Brasileira, pequenas propriedades rurais compram as embalagens a indústrias que fazem algum tratamento térmico. Estes comportamentos já foram registados pela CPLA.

Os resultados obtidos em relação à fonte de contaminação são congruentes com a maioria dos estudos (Adesiyun *et al.*, 1998; Tollersrud *et al.*, 2000; Stephan *et al.*, 2001; Nájera-Sánchez *et al.*, 2003; Fueyo *et al.*, 2005; Jorgensen *et al.*, 2005), todavia, investigações feitas no Brasil revelaram que apesar de linhagens de *S. aureus* de origem bovina parecerem produzir mais SEC, o predomínio é de linhagens produtoras de genes codificadores de SED (Cardoso *et al.*, 2000).

A PCR demonstrou ser eficiente na detecção de genes codificadores de SE's, contudo, é incerto que todas as amostras gene-positivas possam causar intoxicação alimentar. Todavia, a técnica PCR permitiu a detecção do potencial genético para a produção de enterotoxinas, o que a torna útil tanto como um teste de triagem como um teste de confirmação. Devido à grande incidência destas toxinas em géneros alimentícios, é essencial a concepção de um teste de triagem para detectar a prevalência de amostras enterotoxigénicas não apenas no produto lácteo processado mas também dentro da propriedade leiteira.

O estudo seria mais completo, se tivesse sido efectuado um teste complementar, por exemplo teste ELISA, de forma a confirmar a presença das enterotoxinas. Contudo situações como a presença do gene e a não produção de níveis detectáveis de toxinas poderiam ocorrer, devido a um baixo nível de produção de enterotoxina, com limites de detecção não alcançados por um ensaio imunológico.

4. Conclusões

Neste trabalho, foi realizada a análise microbiológica de sete amostras de queijo de coalho do sertão Alagoano e avaliado o potencial enterotoxigénico de diferentes isolados de *S. aureus*. Os resultados obtidos permitiram chegar às seguintes conclusões:

- Nenhuma das amostras analisadas assegurava os requisitos mínimos para garantir a protecção da Saúde Pública, não estando portanto, em conformidade nem com a legislação Brasileira nem com a legislação Europeia. A elevada carga microbiana encontrada nas amostras de queijo avaliadas, revelou evidências de que pode ter ocorrido em algum momento do processamento, falhas como: má qualidade da matéria-prima, contaminações cruzadas por parte dos ordenhadores e manipuladores, pasteurização ineficiente, contacto do alimento com superfícies não sanitizadas, tratamento térmico ineficiente ou utilização de temperaturas impróprias para a conservação do produto. Estes factos indiciam a necessidade de mais vigilância por parte dos órgãos fiscalizadores, para que os alimentos oferecidos não representem riscos para a saúde do consumidor e tenham melhor qualidade.

- A PCR foi eficiente na detecção de genes enterotoxigénicos de *S. aureus*, constatando-se que todas amostras apresentavam genótipos muito diversificados. Este acontecimento, evidência grande especificidade entre os *primers* e as estirpes de *S. aureus* estudadas. Os mesmos *primers* poderão ser utilizados para pesquisa indirecta de SE's clássicas em alimentos provenientes de surtos de intoxicações estafilocócicas.

- Os genes mais amplificados neste estudo foram *sec* (42,5%), *see* (42,5%), resultados congruentes com Zocche *et al.* (2008). Todavia 60% dos genótipos obtidos, correspondiam a combinações de genes, verificando-se que a maioria dos isolados, surgia com co-amplificações. As associações *sec+see* (30%), *sea+sec* (15%), *sea+see* (12,5%) e a *seb+sec* (12,5%), eram as mais frequentes.

- As colónias atípicas possuíram, na sua maioria, mais do que um gene codificador de enterotoxinas, enquanto que os isolados com colónias típicas, apresentaram frequentemente genótipos de um único gene.

- As amostra de queijo B, F e G, provavelmente, sofreram contaminações de origem humana, ou seja contaminação por parte ou dos ordenhadores, pela falta de hábitos de higiene, ou por contaminações cruzadas durante o processamento e/ou distribuição do produto. Já as amostras A, B, E e G, apresentaram provavelmente contaminação de origem bovina. Este facto pode estar relacionado com a má qualidade da matéria-prima devido à ocorrência de mastites na manada.

Em suma, apesar da PCR apenas permitir a identificação das estirpes portadoras dos genes para as toxinas, independente da sua expressão e secreção, ela continua a ser uma alternativa viável e rápida aos dispendiosos métodos imunológicos. Os perfis enterotoxigénicos obtidos juntamente com os resultados das contagens de *S. aureus*, indiciam a produção de toxinas pelas estirpes de *S. aureus* das amostras de queijos de coalho.

5. Bibliografia

Adesiyun, A. A., Lenz, W., Schaal, K. P., (1991). Exfoliative toxin production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from animals and humans beings in Nigeria. *Microbiologica*, Bologna, **14**:357-362.

Anônimo, (1996). Portaria N°146, de 7 de Março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Ministério da Agricultura. Brasil. Brasília, DF, 11 mar, Seção 1, p.3977-3978.

Anônimo, (2000). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N°12, de 02/01/2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Ministério da Saúde. Brasil. Brasília, 02/01/2001. p.1-54.

Antonini, S. R. C., Meneghin, S. P., Urashima, A. S., (2004). Técnicas básicas de biologia molecular. *Apostila*. Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular- Universidade Federal de Santa Catarina, p. 1-57.

Arbuthnott, J. P., Coleman, D. C., Azevedo, J. S., (1990). Staphylococcal toxins in human disease. *Journal of Applied Bacteriology*, London, **19**:101-107.

Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozyki, S., (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*, **130**:33–40.

Balaban, N., Rasooly, A., (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal. Food Microbiology*, **61**:1-10.

Bannerman, T. L., (2003). In: Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H.; Tenover, M. C.; Tenover, R. H. Manual Of Clinical Microbiology. vol.1. 8 ed. Asm Press: Washington, D.C.USA .p.384-404.

Bayles, K. W., landolo, J. J., (1989). Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *Journal of Bacteriology*, Washington, **171**: 4799-4806.

Bergdoll, M. S., (1989). *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker, p. 463-523.

Bohach, G. A., Schlievert, P. M., (1989). Conservation of the Biologically Active Portions of Staphylococcal Enterotoxins C1 and C2. *Infection and Immunity*, Washington, **57**: 2249-2252.

Bohach, G. A., Schlievert, P. M., (1987). Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Molecular and General Genetics*, Berlin, **209**: 15-20.

Boerema, J. A., Clemens, R., Brightwell, G., (2006). Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *International Journal Food Microbiology*, **107**: 192–201.

Borges, M., Arcuri, E., Pereira, J., Feitosa, T., Kuaye, B., (2008). *Staphylococcus* enterotoxigénicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: Revisão. *CEPPA*, Curitiba, **26**: 71-86.

Cardoso, H. F. T., Silva, N., Sena, M. J., Carmo, L. S., (1999). Production of Enterotoxins and Toxic Shock Syndrome Toxin by *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastites in Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, **29**: 347-349.

Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., Agnellini, D., Caramenti, G., Moroni, P., Castiglioni, B., (2005). Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Molecular and Cellular Probes*, London, **19**: 299-305.

Cremonesi, P., Vimercati, C., Castiglioni, B., Luzzana, M., Ruffo, G., (2006). Identification of enterotoxins genes in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and caprine milk. *Veterinary Research Communications*, **30**: 241-243.

Cha, J. O., Lee, J. K., Jung, Y. H., Yoo, J. I., Park, Y. K., Kim, B. S., Lee, Y. S., (2006). Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *Journal of Applied Microbiology*, **101**: 864–871.

Chen, T. R., Chiou, C. S., Tsen, H. Y., (2004). Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology*, **92**: 189-197.

Chiang, Y. C., Liao, W. W., Fan, C. M., Pai, W.Y., Chiou, C. S., Tsen, H. Y., (2008). PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology*, **121**: 66–73.

Corbella, X., (1997). *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Berlin, **16**: 351-357.

Couch, J. L., Betley, M. J., (1989). Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. *Journal of Bacteriology*, Washington, **171**: 4507-4510.

Dingues, M. M., Orwin, P. M., Schlievert, P. M., (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, Minneapolis, **13**: 16-34.

Eley, R. (1996). Microbial Food Poisoning. Department of Medical Microbiology; University of Sheffield Medical School. Sheffield.UK. Segunda Edição: Cap 3; p.37-44.

Eley, R. (1992). Intoxicaciones Alimentarias de Etiologia Microbiana; Ediorial ACRIBIA, S.A.; Zaragoza-España: Cap 3; p.41-48.

Evenson, M. L., Hinds, M. W., Bernstein, R. S., Bergdoll, M.S., (1988). Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology*, **7**: 311–316.

FDA- Food and Drugs Administration, (1992). Bacteriological Analytical Manual, 7th Edition. AOAC International. **Cota:** Q03-305.

Feitosa, T., Borges, M. F., Nassu, R. T., Azevedo, E. H. F., Muniz, C. R., (2003). 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, **23**: 162-165.

Forsythe, S. J., (2000). The microbiology of safe food. London: *Blackwell Science*, p. 155-201.

Frazier, W. C.; Westhoff, D. C., (2000) Microbiologia de los Alimentos. 4ªEdição. Zaragoza: Acribia, p. 681.

Freitas, M. F. L. et al. (2004). Exotoxinas Estafilocócicas. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, Recife, **7**: 63-74.

Fueyo, J. M., (2005). Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, **243**: 447-454.

Giraffa G., Rosseti L., Neviani E. (2000). An evaluation of chelexbased DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, **42**:175-184.

Hesselbarth, J., Schwarz, S., (1995). Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dog, pigeons, horses and mink. *Veterinary Microbiology*, **45**, 11-17.

Hirooka, E. Y. et al., (1988). Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. *International Journal Food Microbiology*, Amsterdam, **7**: 185-19.

Hui, Y. H., Pierson, M.D., Gorham, J.R. (2001). Foodborne Disease Handbook. Second Edition, Revised and Expanded. Vol I. New York. Marcel Dekker, Inc. p.347-372.

ICMSF:International Commission on Microbiological Specifications for Foods.(1996). Microorganismos de los Alimentos: Características De Los Patógenos Microbianos; Editorial Acribia, S.A., Zaragoza-España: cap 17; p.349-385. **Cota:** Q03-405.

Ikeda, T. *et al.*, (2005). Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, **252**: 267-272

Jablonski, L. M., Bohach, G. A., (2001). *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M.P.; Beuchat, L. R; Montville, T.J. (Ed.). Food microbiology, fundamentals and frontiers. Second edition. Washington, ASM, p.411-434.

Jay, J. M., (1996). Modern Food Microbiology, Fifth Edition. New York: Chapman &Hall, 20. p. 429-435. **Cota**: Q03-478.

Johns, J. R, M. B., Khan, A., (1988). Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with discrete genetic element. *Journal of Bacteriology*, Washington, **170**: 4033-4039.

Johnson, H. M., Russell, J. K., Pontzer, C. H., (1991). Staphylococcal enterotoxin microbial superantigens. *FASEB Journal*, Bethesda, **5**: 2706-2712.

Jorgensen, H. J., Mork, T., Hogasen, H.R., Rovik, L.M., (2005). Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 158–167.

Kalia A., Rattan A., Chopra P., (1999). A method for extraction of high quality and high-quantity genomic DNA generally applicable to pathogenic bacteria. *Analytical Biochemistry*, **275**:1-5.

Kamogae, E. M., (1998). Cromatografia de Afinidade com corante RED A Versus Troca Iônica- Permeabilidade em Gel : Comparação da Patricidade na Purificação de Enterotoxina Estafilocócica A. *Ciência e tecnologia dos Alimentos*, **18**:165-168.

Kokan, N. P., Bergdoll, M.S., (1987). Detection of low-enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**: 2675–2676.

Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, 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., (2001). Whole genome sequencing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **357**: 1225–1240.

Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M., (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research* **31**: 63–76.

Luz, I. S., (2008). Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da Região Agreste de Pernambuco. 125f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife

MacLauchlin, J., Narayanan, G. L., Mithani, V., O'Neill, G., (2000). The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, **63**: 479–488.

Rosec, J. P., Gigaud, O., (2002). Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology*, **77**: 61–70.

Marr, J. C. *et al.*, (1993). Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. *Infection and Immunity*, Washington, **61**: 4254-4262.

Martin, M. C. *et al.*, (2004). Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, **94**: 279-286.

Meyrand, A., Folio, P., Giraudon, N., Hadj-Amar, D., Cavaud, M. C., Reynaud, A., Vernoz, R.C., (2000). Comparaison d'une nouvelle technique d'extraction-concentration des entérotoxines staphylococciques par rapport à la méthode de référence dans les produits laitiers. *Reveu Médecine Vétérinaire*. França, **3**: 205-211.

Munson, S. H., Tremaine, M. T., Betley, M. J., Welch, R. A., 1998. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* **66**: 3337–3348.

Nájera-Sánchez, G., Maldonado-Rodríguez, R., Olvera, P.R., de la Garza, L.M., (2003). Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of

enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *Journal of Food Protection*, **66**: 1055–1062.

Nashev, D., Toshkova, K., Bizeva, L., Akineden, Ö., Lämmler, C., Zschöck, M., (2007). Distribution of enterotoxin genes among carriage and infection associated isolates of *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, **45**: 681–685.

Nassu, R. T, Moreira, C. G., Rocha, R. G., Feitosa, T., Borges, M. de F., Macedo, A.A.M., (2000). Diagnóstico das condições de processamento e qualidade microbiológica de produtos regionais derivados do leite produzidos no estado do Rio Grande do Norte. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora*, **55**: 121-126.

Novak, F. R., (1999). Ocorrência de *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina em Leite Humano Ordenhado. 102f. Tese (Doutorado em Ciências)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Novick, R. P., (2000). Pathogenicity factors and their regulation. In: Gram Positive Pathogens (Fischetti, V.A., Novick, R.P., Feretti, J.J., Portnoy, D.A., and Rood, J.I., eds.). ASM Press, Washington, DC, USA, p.392-407.

Novick, R. P., (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology*, Oxford, **48**: 1429-1449.

Oh, S. K., Lee, N., Cho, Y. S., Shin, D. B., Choi, S. Y., Koo, M., (2007). Occurrence of toxigenic *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat food in Korea. *Journal of Food Protection*, **70**: 1153–1158.

Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D. L., Ueda, S., Shinagawa, K., (2002). Detection of seg, seh and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of enterotoxins productivities of S. aureus isolates harboring seg, seh or sei genes. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**: 857–862.

Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D. L., Ueda, S., Shinagawa, K., (2005). Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, **246**:191-198.

Ortega, E., Abriouel, H., Lucas, R., Galvez, A., (2010). Multiple roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. *Toxins*, **2**: 2117-2131.

Paiva, M. S. D., Cardonha, A. M. S., (1999). Queijo de coalho artesanal e industrializado, produzidos no Rio Grande do Norte: estudo comparativo da qualidade microbiológica. *Revista Higiene Alimentar*. São Paulo, **13**: 33.

Regulamento (CE) nº 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial da Comunidade Europeia L 338/1.

Regulamento (CE) nº 1441/2007 da Comissão, de 5 de Dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) Nº 2073/2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial da Comunidade Europeia L322/12.

Regulamento (CE) nº 365/2010 da Comissão, de 28 de Abril de 2010, que altera o Regulamento (CE) Nº 2073/2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios no que diz respeito a Enterobacteriaceae no leite pasteurizado e noutros produtos lácteos líquidos pasteurizados e a *Listeria monocytogenes* no sal alimentar. Jornal Oficial da Comunidade Europeia L 107/9.

Rocha, J. S., Buriti, F. C. A., SAAD, S. M. I., (2006). Condições de processamento e comercialização de queijo de minas frescal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, São Paulo, **58**: 263-272.

Santana, E. H. W., Beloti, V., Oliveira, T. C. R. M, Moraes, L. B, Tamanini, R., Silva, W. P., (2008). Staphylococci: colonies morphological characteristics, coagulase and EEA production collected from raw milk samples. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, **27**: 639-64

Santiliano, F. C., Almeida, B. R., Ignacchiti, M. D. C., Júnior, O. S. P., (2011). Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. *PUBVET*, Londrina, v. 5, n. 3, Ed. 150, Art. 1009.

Santos, F. A., Nogueira, N. A. P., Cunha, G. M.A., (1995). Aspectos microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em Fortaleza – Ceará. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, **13**: 31-361.

Silva, C., (1999). Bacteriologia: um texto ilustrado; EVENTOS Livraria e Editora. Teresópolis-RJ: p.121-134.

Silva, W. P., Destro, M. T., Landgarf, M., Franco, B. D. G. M., (2000). Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, **31**: 103-106.

Siqueira, A., (2009). Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Apresentação Power Point: 15 slides.

Sneath, P. H. A., Mairn, N. S., Sharpe, M. E. & Holt, J. G. E., (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol.II. Baltimore, Williams & Wilkins. p. 1013-1035. **Cota**: Z32-195.

Stephen, R., Annemuller, C., Hassan, A.A., Lammler, Ch., 2001. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Veterinary Microbiology*, **78**: 373–382.

Tollersrud, T, Kenny K, Caugant DA, Lund A (2000) Characterization of isolates of *Staphylococcus aureus* from acute, chronic and subclinical mastitis in cows in Norway. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica*. **108**: 565-572.

Tremaine, M. T., Brockman, D. K., Betley; M. J., (1993). Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene (*agr*). *Infection and Immunity*, Washington, **61**: 356-359.

Veras, J. F., Carmi, L. S., Tong, L. C., Shupp, J. W., Cummings, C., Santos, D. A., Cerqueira, M. m. O. P., Cantini, A., Nicolli, J. R., Jett, M., (2008). A study of enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*. Amsterdam, **12**: 410-415.

Vernozy-Rozand, C., Mazuy-Cruchaudet, C., Bavai, C., Richard, Y., (2004). Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. *Letters in Applied Microbiology*, **39**: 490–494.

WHO-World Health Organization, (2000). Surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe 1993-1998. 7th report.

Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E. *et al.*, (2006). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial Pathogenesis*, London, **40**: 177-183.

Zschock, M., Barbel K., Wolter, W., Hamman, H.P., Lammler, Ch., (2005). Pattern of enterotoxin genes seg, seh, sei and sej positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, **108**: 243–249.

Zocche, F., Correa R.F., Guimarães, A., Nunes, A. M., Padilha, W., (2009) PCR Multiplex para Detecção de *Staphylococcus aureus* Enteroxigênicos isolados de Alimentos de Origem Animal no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Interciencia*, **34**: 487-491.

6. Cibergrafia

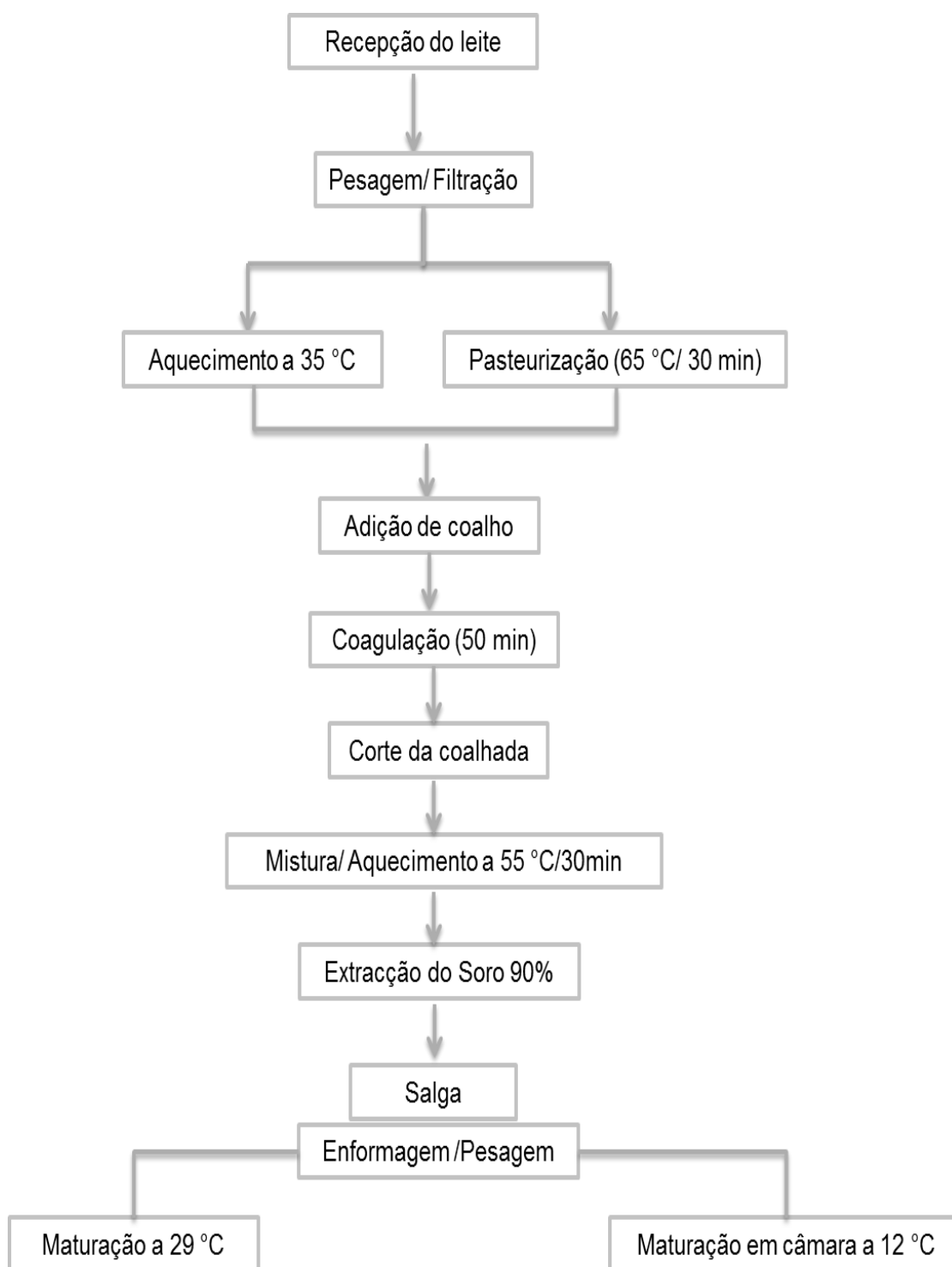
Bennett, R. W., (2001). Staphylococcal enterotoxins. Micro-slide double diffusion and ELISA based methods. FDA/Bacteriological Analytical Manual. Chapter 13A. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM073674#authors>. Consultado pela última vez a 1 de Outubro de 2011

European Comission, (2003). Staphylococcal Enterotoxins in Milk Products, Particularly Cheeses. Health & Consumer Protection Directorate-General. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out61_en.pdf. Consultado pela última vez a 29 de Setembro de 2011.

Euzéby, J. P., (2008). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html. Consultado pela última vez a 5 Setembro de 2011.

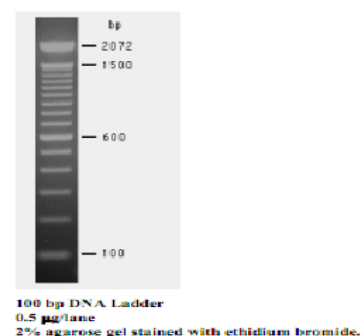
7. Anexos

Anexo 1: Fluxograma do processamento de queijo de coalho.



Anexo 2: Preparação do Marcador**Características:**

- 100 bp DNA Ladder da marca Invitrogen (Carlsbed-USA)
- Ref^a 15628-019 (quantidade/embalagem: 50 µg)
- Concentração: 1µg/µL (solução stock)



Consiste em 15 fragmentos entre 100 e 1500 bp em múltiplos de 100 bp e um fragmento adicional em 2072 bp. A banda de 600 bp é aproximadamente 2 a 3 vezes mais brilhante do que as outras bandas do marcador para fornecer orientação interna. Este marcador é adequado para medir tamanhos de fragmentos de DNA entre os 100 e 1500 bp, mas não está desenhado para quantificação.

O marcador é usado com uma concentração de 50 ng/µl (solução de trabalho)

Para a preparação de uma solução de 100µL, recorreu-se à equação das diluições:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Onde C_i é a concentração inicial, C_f concentração final, V_i é o volume inicial e V_f é o volume final.

$$V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i}$$

$$V_i = \frac{50\text{ng}/\mu\text{L} \times 100\mu\text{L}}{1000\text{ng}/\mu\text{L}} = \frac{5000\mu\text{L}}{1000} = 5\mu\text{L}$$

Logo, para 100µL de marcador, com uma concentração de 50ng/µL, pipetou-se 5µL de marcador (1µg/µL) e adicionou-se 95µL de água destilada ultra pura. Porém como o marcador vai ser depositado num gel de agarose, adicionou-se uma solução que lhe conferiu peso, gel loading 6x, para que o mesmo não saísse dos poços. Segundo recomendações da Sigma, adicionar 1µL de gel loading por 5 de amostra. Ou seja para 100 µL de marcador de trabalho, temos 5 µL de marcador (1µg/µL) , 20µL de gel loading e 75µL de água destilada ultra pura.

Anexo 3: Soluções e Tampões**TE (1 X) - 10mM Tris / 1mM EDTA**

50µL de Tris-HCl 2M pH8,0
20µL de EDTA 0,5M pH 8,0
9.93mL de H₂O milli-Q
Ajustar o pH final da solução para 7,2 – 7,4

TAE 50X

500mL de H₂O milli-Q
121g de Tris Base
28,5mL de Ácido acético glacial
50mL de EDTA 0,5M pH 8,0
Filtrar em nitrocelulose, armazenar à temperatura ambiente

TAE 1x

10mL de TAE 50x
490mL de H₂O milli-Q

Fenol-Clorofórmio-isoamílico

(25:24:1)

25mL de Fenol
24mL de Clorofórmio
1mL de álcool isoamílico

Gel loading 6x

Azul bromofenol (0,25% w / v)
Xileno cyanole FF (0,25% w / v)
Sacarose (40% w / v).
1 Volume de gel loading para 4-5 volumes de amostra e misturar bem.

Tampão STE 1x

5mL de Tris 1M pH 8,0
2mL de EDTA 0,25M
0,3g NaCl
Prefazer até aos 100mL com H₂O milli-Q

Anexo 4: Enumeração de Coliformes totais e fecais

Quadro 15: Resultados obtidos na enumeração de Coliformes totais e fecais.

Amostra	Caldo LAURIL 36°C/24-48h				Caldo EC 45°C/24-48h				NC*	NMP/g**
	10 ⁻¹	+	+	+	10 ⁻¹	+	+	+		
Queijo A	10 ⁻¹	+	+	+	10 ⁻¹	+	+	+	321	15
	10 ⁻²	+	+	+	10 ⁻²	+	+	+		
	10 ⁻³	+	+	+	10 ⁻³	+	+	-		
	10 ⁻⁴	+	+	+	10 ⁻⁴	+	-	-		
Queijo B	10 ⁻¹	+	+	+	10 ⁻¹	+	+	+	322	21
	10 ⁻²	+	+	+	10 ⁻²	+	+	+		
	10 ⁻³	+	+	+	10 ⁻³	+	+	-		
	10 ⁻⁴	+	+	+	10 ⁻⁴	+	-	-		
Queijo C	10 ⁻¹	+	+	+	10 ⁻¹	+	+	+	323	29
	10 ⁻²	+	+	+	10 ⁻²	+	+	+		
	10 ⁻³	+	+	+	10 ⁻³	+	-	+		
	10 ⁻⁴	+	+	+	10 ⁻⁴	+	+	+		
Queijo D	10 ⁻¹	+	+	+	10 ⁻¹	+	+	+	323	29
	10 ⁻²	+	+	+	10 ⁻²	+	+	+		
	10 ⁻³	+	+	+	10 ⁻³	+	+	-		
	10 ⁻⁴	+	+	+	10 ⁻⁴	+	+	+		
Queijo E	10 ⁻¹	+	+	+	10 ⁻¹	+	+	+	333	>110
	10 ⁻²	+	+	+	10 ⁻²	+	-	+		
	10 ⁻³	+	+	+	10 ⁻³	+	+	+		
	10 ⁻⁴	+	+	+	10 ⁻⁴	+	+	+		
Queijo F	10 ⁻¹	+	+	+	10 ⁻¹	+	+	+	333	>110
	10 ⁻²	+	+	+	10 ⁻²	+	+	+		
	10 ⁻³	+	+	+	10 ⁻³	+	+	+		
	10 ⁻⁴	+	+	+	10 ⁻⁴	+	+	-		
Queijo G	10 ⁻¹	+	+	+	10 ⁻¹	+	+	+	333	>110
	10 ⁻²	+	+	+	10 ⁻²	+	+	+		
	10 ⁻³	+	+	+	10 ⁻³	+	+	+		
	10 ⁻⁴	+	+	+	10 ⁻⁴	+	+	+		

Legenda: (+) Turvação com produção de gás; (-) Turvação sem produção de gás.

*NC= número de tubos positivos observados nas diluições escolhidas.

**NMP= Número Provável de organismos por g de amostra.

Anexo 5: Resultados obtidos na pesquisa de *Salmonella* spp.

Quadro 16: Características das colônias de *Salmonella* spp.

Queijo A	Rappaport	XLD	Colônias de cor-de-rosa escuro com centro preto e colônias todas pretas características de estirpes H ₂ S(+).
		BPLS	Ausência de colônias de <i>Salmonella</i> , presença de colônias de lactose sacarose (+).
	Selenito	XLD	Ausência de colônias de <i>Salmonella</i> .
		BPLS	
Queijo B	Rappaport	XLD	Colônias de cor rosa escuro, com centro preto e uma zona avermelhada levemente translúcida.
		BPLS	Ausência de colônias de <i>Salmonella</i> , presença de colônias de lactose sacarose (+).
	Selenito	XLD	Colônias de cor rosa escuro, com centro preto e uma zona avermelhada levemente translúcida.
		BPLS	Acidificação do meio apresenta cepas verdes amareladas, o que indica a presença de MO fermentadores de lactose.
Queijo C	Rappaport	XLD	Ausência de colônias de <i>Salmonella</i> .
		BPLS	
	Selenito	XLD	Colônias de cor rosa escuro, com centro preto.
		BPLS	Acidificação do meio apresenta colônias verdes amareladas, o que indica a presença de MO fermentadores de lactose.
Queijo D	Rappaport	XLD	Colônias de cor rosa escuro, com centro preto.
		BPLS	Ausência de colônias típicas de <i>Salmonella</i> .
	Selenito	XLD	Colônias de cor-de-rosa escuro com centro preto e colônias todas pretas características de estirpes H ₂ S(+).
		BPLS	Ausência de colônias típicas de <i>Salmonella</i> .
Queijo E	Rappaport	XLD	Colônias de cor rosa escuro, com centro preto e uma zona avermelhada levemente translúcida.
		BPLS	Ausência de colônias de <i>Salmonella</i> .
	Selenito	XLD	Colônias de cor rosa escuro, com centro preto.
		BPLS	Acidificação do meio apresenta colônias verdes amareladas, o que indica a presença de MO fermentadores de lactose.
Queijo G	Rappaport	XLD	Colônias de cor rosa escuro, com centro preto.
		BPLS	Ausência de colônias típicas de <i>Salmonella</i> .
	Selenito	XLD	Colônias de cor-de-rosa escuro com centro preto e colônias todas pretas características de estirpes H ₂ S(+).
		BPLS	Ausência de colônias típicas de <i>Salmonella</i> .

No quadro 17 estão apresentados os resultados relativos à presença ou ausência de *Salmonella* spp. em sete amostras de queijo de coalho do estado de Alagoas. Ausência de crescimento em ambos os meios para o queijo F.

Quadro 17: Resultados relativos aos testes preliminares e aos testes bioquímicos envolvidos na pesquisa de *Salmonella* spp.

	Colónia	TSI	LIA	SIM	INDOL	Urease	Citrato	Malonato	Oxidase	VM-VP
Queijo A	A1	+	+	+	-	-	+	-	-	+ -
	A2	-	-	-	-	Não tem comportamento de <i>Salmonella</i>				
Queijo B	B1	+	+	+	-	+	Não tem comportamento de <i>Salmonella</i>			
	B2	+	+	+	-	-	+	-	-	+ -
Queijo C	C1	-	-	-	-	Não tem comportamento de <i>Salmonella</i>				
	C2	-	-	-	-					
Queijo D	D1	-	-	-	-	Não tem comportamento de <i>Salmonella</i>				
	D2	-	-	-	-					
Queijo E	E1	-	-	+	-	Não tem comportamento de <i>Salmonella</i>				
	E2	+	+	+	-	-	-	-	-	- -
Queijo F	Não se verificaram colónias típicas de <i>Salmonella</i> em nenhum dos meios.									
Queijo G	G1	-	-	+	-	Não tem comportamento de <i>Salmonella</i>				
	G2	+	+	+	-	-	+	-	-	+ -

Anexo 6: Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Quadro 18: Resultados dos testes bioquímicos.

	Fraser	PALCAM		Teste da catalase	Teste do nitrato	Teste mobilidade	Teste VM-VP
		Cepas	Descritivo				
Queijo A	Meio acastanhado	A1	Presença de pequenas colónias verdes -acinzentadas	+	+	_____	
		A2	Presença de pequenas colónias verdes -acinzentadas	+	+	-	_____
Queijo B	Meio acastanhado	B1	Ausência de crescimento	_____			
		B2					
		B3					
Queijo C	Meio acastanhado	C1	Presença de pequenas colónias verdes -acinzentadas	-	_____		
		C2	Presença de pequenas colónias verdes -acinzentadas	-	_____		
Queijo D	Meio amarelado	_____					
Queijo E	Meio acastanhado	E1	Presença de pequenas colónias verdes -acinzentadas	+	+	_____	
		E2	Presença de pequenas colónias verdes -acinzentadas	+	-	+	+ -
Queijo F	Meio amarelado	_____					
Queijo G	Meio amarelado	_____					

Anexo 7: Contagem de *Staphylococcus aureus*
Quadro 19: Resultados das contagens de *S. aureus* nas várias diluições

Volume (ml)	Contagem de colónias						
	10^{-1}				10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1
Queijo A	Inc	Inc	Inc	Inc	>300	82	10
Queijo B	Inc	Inc	Inc	Inc	>300	110	9
Queijo C	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	>300	22
Queijo D	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	>300	53
Queijo E	Inc	Inc	Inc	Inc	>300	>300	192
Queijo F	Inc	Inc	Inc	Inc	>300	>300	151
Queijo G	Inc	Inc	Inc	Inc	>300	>300	160

Quadro 20: Resultados referentes aos testes da catalase e da coagulase

Queijo	A1T	A2T	A3T	A4T	A5T	A1A	A2A	A3A	A4A	A5A
Queijo A	Negativo	Negativo	+ 4+	+ 3+	- 2+	+ 4+	+ 4+	+ 4+	+ 4+	+ 4+
Queijo B	B1T	B2T	B3T	B4T	B5T	B1A	B2A	B3A	B4A	B5A
	+ 3+	Negativo	- 2+	Negativo	+ 4+	+ 4+	+ 4+	+ 4+	+ 3+	+ 4+
Queijo C	C1T	C2T	C3T	C4T	C5T	C6T	C7T	C1A	C2A	C3A
	+ 3+	+ 3+	Negativo	+ 4+	+ 3+	+ 3+	+ 3+	- 2+	Negativo	+ 4+
Queijo D	D1T	D2T	D3T	D4T	D5T	D6T	D7T	D2A	D3A	D4A
	Negativo	+ 3+	+ 4+	+ 4+	+ 2+	- 2+	- 2+	- 2+	Negativo	+ 4+
Queijo E	E1T	E2T	E3T	E4T	E5T	E6T	E1A	E2A	E3A	E4A
	- 2+	+ 3+	+ 2+	+ 1+	+ 3+	+ 3+	+ 4+	+ 2+	+ 3+	+ 1+
Queijo F	F1T	F2T	F3T	F4T	F5T	F6T	F1A	F2A	F3A	F4A
	+ 2+	+ 3+	+ 4+	+ 4+	+ 4+	+ 2+	+ 4+	- 1+	+ 4+	+ 2+
Queijo G	G1T	G2T	G3T	G4T	G5T	G6T	G7T	G1A	G2A	G3A
	- 1+	+ 2+	+ 3+	+ 3+	- 4+	+ 4+	+ 4+	+ 3+	- 2+	- 2+

Legenda: Catalase: (+) ou (-); Coagulase: negativo, ou de acordo com os níveis de coagulação 1+; 2+ 3+, 4+;

Anexo 8: Características das colónias e genes codificadores de enterotoxinas presentes nos isolados.

Isolado	CARACTERÍSTICAS DA COLÓNIA										sea	seb	sec	sed	see	Observações
	Pequena	Média	Grande	Cinza	Preta	Lisa	Viscosa	Com Halo	Sem Halo							
A ₄ T			+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-		
A ₄ A	+			-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+		
A ₃ T			+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-		
A ₂ A	+			-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+		
A ₃ A	+			-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+		
A ₅ A	+			-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-		
A ₁ A	+			-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-		
B ₅ A	+			-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+		
B ₄ A		+		-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+		
B ₂ A		+		-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-		
B ₃ T			+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+		
B ₁ T		+		-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+		
B ₃ A		+		-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+		
B ₅ T			+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-		
B ₁ A	+			-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+		
C ₂ T			+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-		
C ₆ T			+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-		
C ₄ T			+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-		
C ₁ T		+		-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-		
C ₃ A	+			-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-		
C ₇ T	+			-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-		
C ₃ T		+		-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-		
C ₅ T			+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+		

Isolado	CARACTERÍSTICAS DA COLÔNIA										sea	seb	sec	sed	see	Observações
	Pequena	Média	Grande	Cinza	Preta	Lisa	Viscosa	Com Halo	Sem Halo							
D ₂ T			+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-		
D ₄ T			+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+		
D ₄ A			+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-		
D ₃ T		+		-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-		
E ₄ A	+			-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+		
E ₂ T	+			-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-		
E ₆ T	+			-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-		
E ₃ A		+		-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+		
F ₃ A			+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-		
F ₃ T			+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+		
F ₁ A	+			-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+		
F ₂ A	+			-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-		
F ₄ T		+		-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-		
G ₁ T			+	-	+	+	+	+	-		+	+	-	+		
G ₄ T			+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-		
G ₃ T			+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-		
G ₇ T		+		-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+		

Legenda: (+) Presença; (-) Ausência