

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Vera Lúcia Mores Rall

Microbiologia de alimentos: condições higiênico-sanitárias
e pesquisa de fatores de virulência
de patógenos por técnicas clássicas e moleculares

Texto sistematizado de linha de pesquisa apresentado ao Instituto de Biociências de Botucatu como parte das exigências para obtenção do título de Professor Livre-Docente em Microbiologia Médica.

Botucatu – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

VERA LÚCIA MORES RALL

MEMORIAL

Memorial apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como parte das exigências para a obtenção do título de Livre-Docente em Microbiologia

Botucatu – SP

2012

Texto de Livre Docência

Rall, Vera Lúcia Mores.

Microbiologia de Alimentos: condições higiênico-sanitárias e pesquisa de fatores de virulência de patógenos por técnicas clássicas e moleculares/ Vera Lúcia Mores Rall. - Botucatu, 20129

Texto (livre docência) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2012

Capes: 40101002

Palavras-chave: *Salmonella*; *Staphylococcus aureus*; biofilme; enterotoxinas; PCR.

Dedicatória

Dedico esse trabalho:

- ao Ricardo, meu querido companheiro nessa jornada, pelo apoio, dedicação, paciência, carinho e amor.

- aos meus maiores tesouros, que atendem pelos nomes de Ricardo (meu "Vica"), Lígia (minha "Igi") e Luísa (minha "Uíza"). Amor infinito.

- ao meu pai Carlos, minha mãe Lígia e minha tia Esther, por tudo que fizeram e pela falta que fazem.

- a DEUS, que me permite trilhar meu caminho de maneira tão suave, com algumas pedras ocasionais.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus amigos e colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia. Alguém disse que “felicidade é fazer do seu dever, o seu prazer” e posso dizer que aqui, eu consegui isso, onde a convivência com a imensa maioria é muito boa, gratificante, enriquecedora. A começar pelas secretárias, Sonia M. Faraldo, Leonice A. Garcia e Ana Claudia Acerra; os servidores Pedro Oyan, Luiz S. dos Santos, Luiz H. Alquati e Isaltino O. de Oliveira; aos Profs. Drs. Ary Fernandes Júnior, Josias Rodrigues, Eduardo Bagagli, Sandra de M. G. Bosco, João M. G. Candeias, João P. Araújo Junior, Alexandrina Sartori, Ângela M. V. C. Soares, José Maurício Sforcin, Maria Terezinha S. Peraçoli, Ramon Kaneno, Silvio L. Oliveira, Carlos Alberto M. Lopes e Maria de Fatima Sugizaki.

- À Profa. Dra. Terue Sadatsune, por TUDO... não tenho palavras.

- Ao Prof. Dr. Augusto Cezar Montelli, por ser meu professor, orientador, “pai postiço”.

- Ao Prof. Dr. Sebastião Timo Iaria (*in memoriam*). Meu mestre.

- À Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva e Prof. Dr. Reinaldo José da Silva, dupla dinâmica (literalmente), por quem tenho muito carinho e respeito.

- Ao Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto, por todos esses anos de companheirismo e “quebras galho”.

- À Ivana, Natália, Bruna, Stefani, Lívia, Paulo, Lúcia, Mirella, Danilo, Ana Caroline e Carolina, meus atuais orientados. A vocês agradeço toda a paciência e boa vontade. Também agradeço a todos os meus antigos alunos, os quais tive o prazer de orientar.

- Às agências de fomento a Pesquisa (FAPESP, FUNDUNESP, e CAPES) que possibilitaram o desenvolvimento de inúmeros projetos e, de maneira direta, o meu crescimento profissional. Agradeço também as bolsas, concedidas a mim e aos meus alunos.

SUMÁRIO

	Pág.
I. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
II. MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS	2
2.1. Qualidade microbiológica de alimentos	2
2.2. <i>Staphylococcus</i> spp	16
2.2.1. Características Gerais	16
2.2.2. Enterotoxinas de <i>Staphylococcus</i> sp	18
2.2.2.1. Enterotoxinas de <i>Staphylococcus</i> sp em alimentos	22
2.2.2.2. Enterotoxinas de <i>Staphylococcus</i> sp isolados de manipuladores	48
2.2.3. Produção de biofilme por <i>Staphylococcus</i> sp	62
2.3. <i>Salmonella</i> sp	71
2.3.1. Características Gerais	71
2.3.2. Produção de biofilme	74
III. Considerações Finais e Perspectivas Futuras	100
IV. Referências Bibliográficas	101

ANEXOS

	Pág
Anexo 1	144
Anexo 2	148
Anexo 3	158
Anexo 4	164
Anexo 5	170
Anexo 6	176
Anexo 7	183
Anexo 8	192
Anexo 9	197
Anexo 10	201
Anexo 11	209

FIGURAS

	Pág
Figura 1. Gel de eletroforese do produto da PCR dos genes das toxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J de <i>Staphylococcus aureus</i> .	30
Figura 2. Distribuições dos genes produtores de enterotoxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J, das cepas cepas isoladas do leite cru, pasteurizado e na data de validade.	32
Figura 3. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene da toxina M.	46
Figura 4. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene da toxina N.	46
Figura 5. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene da toxina O.	46
Figura 6. Distribuição das espécies de <i>Staphylococcus</i> , isoladas a partir de 82 manipuladores de alimentos, em três cozinhas industriais, na cidade de Botucatu.	55
Figura 7. Distribuição dos genes das enterotoxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J entre os estafilococos coagulase negativa e positiva.	60
Figura 8. Colônias pretas, positivas (+) para a produção de biofilme e vermelhas, negativas (-), para a não produção.	66
Figura 9. Produção de biofilme em microplaca.	66
Figura 10. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene <i>icaA</i> .	69
Figura 11. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene <i>bap</i> .	69
Figura 12. Colônias características de <i>Salmonella</i> no ágar CHROMagar.	86

Figura 13. Colônias características de <i>Salmonella</i> no ágar Rambach.	86
Figura 14. Colônias características de <i>Salmonella</i> no ágar XLD.	86
Figura 15. Colônias características de <i>Salmonella</i> no ágar SS.	86
Figura 16. Colônias características de <i>Salmonella</i> no ágar VB.	86
Figura 17. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene <i>invA</i>.	88
Figura 18. Biofilme de <i>Salmonella</i> spp. produzido em aço inox.	96
Figura 19. Biofilme de <i>Salmonella</i> spp. produzido em vidro.	96
Figura 20. Biofilme de <i>Salmonella</i> spp. produzido em PVC.	96
Figura 21. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene <i>agfD</i>.	97
Figura 22. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene <i>adrA</i>.	97
Figura 23. Diferentes tipos morfológicos apresentados pelas cepas de <i>Salmonella</i> spp em caldo LB.	98

TABELAS

	Pág
Tabela 1. Enterotoxinas produzidas pelas cepas de <i>S. aureus</i>, isolados de diferentes alimentos.	29
Tabela 2. Perfil genotípico das cepas de <i>S. aureus</i>, isolados a a partir do leite cru, pasteurizado e na data de validade, em relação às toxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J.	31
Tabela 3. Espécies de <i>Staphylococcus</i> isoladas a partir de doces.	36
Tabela 4. Presença de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa ou positiva, isolados a partir de fossas nasais e/ou mãos de manipuladores em 3 cozinhas industriais.	52
Tabela 5. Perfis de isolamento, segundo o local de coleta e a espécie de <i>Staphylococcus</i> identificada, nas três cozinhas estudadas.	54
Tabela 6. Presença de genes que codificam para a produção de enterotoxinas em <i>Staphylococcus</i> sp, isolados de fossas nasais e mãos de manipuladores de alimentos.	57
Tabela 7. Presença dos genes <i>bap</i> e <i>icaA</i> e dos testes de produção de biofilme <i>in vitro</i> (ágar vermelho Congo e microplaca), pelas cepas de <i>Staphylococcus</i> sp. isoladas de leite de vacas saudáveis e com mastite clínica ou subclínica.	67
Tabela 8. Produção de biofilmes por <i>Salmonella</i> spp., isolada de frango, em diferentes materiais e temperaturas.	91
Tabela 9. Produção de biofilmes por cepas de <i>Salmonella</i> isoladas de carcaças de frango, em três matérias diferentes.	93

I. CONSIDERAÇÕES INICIAIS:

Após minha formatura, em 1989, minha única certeza era que a pós-graduação também seria na área de bacteriologia e meu primeiro contato com a Microbiologia de Alimentos foi quase ao acaso. Literalmente “trombei” com o maior responsável pela minha escolha, meu Orientador de mestrado e doutorado, o Prof. Dr. Sebastião Timo Iaria. A ele devo meus conhecimentos e minha paixão por essa área.

Essa linha de pesquisa pode ser, e é, considerada muito ampla. Mas, por não ter me dedicado à pesquisa de somente um micro-organismo, acredito ter adquirido uma visão global e conceitos gerais que me permitiram o exercício da docência de uma maneira muito mais eficiente.

Vários trabalhos visaram somente a pesquisa das condições higiênico-sanitárias de inúmeros alimentos (matéria- prima ou alimento pronto ao consumo), a fim de classificá-los em relação à sua sanidade. Eram trabalhos gratificantes, pois sempre dávamos retorno aos donos dos estabelecimentos comerciais envolvidos e, em várias ocasiões, estes pediram auxílio para a melhoria das suas condições de produção. Pelo amadurecimento científico, imposto pelos resultados, literatura e avanços na tecnologia, desafios foram sendo criados (além da curiosidade) por maiores informações sobre os principais patógenos veiculados por alimentos, como *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*.

Assim, iniciamos, em nosso laboratório, a pesquisa de genes que codificavam diferentes fatores de virulência desses micro-organismos, como a produção de biofilme e de enterotoxinas, além da verificação dessa produção *in vitro*, em diferentes condições.

O texto a seguir foi redigido de acordo com o disposto no artigo 6º da Resolução UNESP nº 27 de 14 de abril de 2009, o qual, dentre as provas realizadas para obtenção do título de Livre-Docente, inclui a defesa de uma tese ou texto que sistematize criticamente a obra do candidato ou parte dela, resumizando de forma integrada os trabalhos desenvolvidos pelo candidato dentro de uma linha de pesquisa, evidenciando a originalidade de sua contribuição nos campos da ciência.

II. MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

2.1. Qualidade microbiológica de alimentos

A sanidade microbiológica dos alimentos é uma das maiores preocupações dos consumidores, em todo o mundo. Pois, apesar de consideráveis avanços na tecnologia, na conscientização dos produtores e consumidores e nas leis que regulamentam a qualidade dos produtos, doenças de origem alimentar continuam sendo um dos maiores desafios da saúde pública.

Um surto de origem alimentar é caracterizado quando: (a) duas ou mais pessoas apresentam sintomas similares após ingestão do mesmo alimento e (b) a análise epidemiológica implica o alimento como a fonte da doença (BEAN et al., 1990).

As enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) continuam aumentando em todo o mundo, principalmente pela manipulação inadequada dos alimentos pelo próprio consumidor e por manipuladores que não estão informados dos perigos; maior interesse pelo consumo dos chamados "alimentos naturais", que incluem alimentos de origem animal consumidos crus ou mal cozidos; grande população de pessoas imunodeprimidas devido a AIDS, câncer e transplantes; ocorrência de bactérias emergentes e aumento contínuo da população idosa. Além disso, devido à entrada das mulheres no mercado de trabalho, a dificuldade de locomoção do local de trabalho até a residência e a falta de tempo para o preparo dos alimentos, fez com que a escolha por refeições fora de casa tenha crescido tanto (MESSIAS, 2007). De acordo com a ABERC (2012), 16 milhões de pessoas fizeram refeições fora de casa em 2011 e as estimativas para 2012 chegam a 18 milhões.

Segundo o Center for Disease Control and Prevention (Centro de Controle de Doenças e Prevenção – CDC, 2012), somente nos Estados Unidos, anualmente, um em cada 6 americanos (isto é, 48 milhões de pessoas) fica doente, 128.000 são hospitalizados e 3.000 morrem, por doenças de origem alimentar. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (MS,

2012), ocorreram cerca de 95.000 internações, entre 1999-2004, com 1.580 óbitos, a um custo de 46 milhões de reais.

A qualidade microbiológica dos alimentos no Brasil é determinada pela pesquisa de indicadores higiênico-sanitários e de alguns patógenos, dependendo do tipo de alimento envolvido, pela Resolução 1892, sugeriu-se o uso de *E. coli* como indicador de poluição fecal, por ser de isolamento mais fácil que o de *Salmonella*. Entretanto, em 1914, o Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos alterou este parâmetro, sugerindo o chamado grupo coliforme (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

Os coliformes totais compreendem bactérias Gram negativas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos, que fermentam a lactose com produção de gás a 35°C, em até 48 horas. Este grupo é formado, principalmente, pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*, embora também possa englobar micro-organismos não incluídos na família Enterobacteriaceae, como os pertencentes ao gênero *Aeromonas* (ANDREWS et al., 2001).

O grupo dos coliformes termotolerantes inclui, principalmente, *Escherichia coli* (habitat exclusivamente intestinal) e *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. termorresistentes (intestinal ou ambiental). Alguns pesquisadores sugerem o retorno da detecção e enumeração de *E. coli* como o indicador de poluição fecal. Esses coliformes são separados dos totais pela temperatura e tempo de incubação, de 45°C por 24 horas (DOWNES; ITO, 2001).

Minha primeira experiência com a avaliação higiênico-sanitária dos alimentos aconteceu no meu Doutorado, onde analisamos pratos a base de carne moída (carne moída cozida, quibe e almôndega) em oito hospitais da cidade de São Paulo, que serviria de ferramenta para a determinação dos pontos críticos de controle (PCCs) nas diferentes plantas de produção. Inicialmente tive receio, pois esperava, nessas cozinhas, alimentos de ótima qualidade microbiológica. Qual não foi meu espanto e decepção com o descaso dos responsáveis, pois a convivência diárias nesses hospitais, me mostrou uma realidade totalmente diferente. Esse projeto foi financiado pela FAPESP (Processo 95/00084-0) e gerou o artigo **Pedroso et al. (1999)**.

Posso dizer que projetos que somente avaliam a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos me trazem “sentimentos conflitantes”. Por um lado, é extremamente gratificante, pois geralmente damos retorno das análises aos responsáveis pelos estabelecimentos comerciais, gerando agradecimentos à Universidade e surpresas com os resultados, que acabam gerando ações por parte dos comerciantes, no sentido de corrigir os erros, com mudanças de marcas dos produtos, orientação para a compra de livros didáticos sobre higiene de ambiente e manipuladores, etc. Além disso, os alunos ficam extremamente interessados quando identificam patógenos como *Salmonella* e *S. aureus*, nos alimentos que até consomem no seu dia a dia. Entretanto, esses projetos geralmente são destinados à Iniciação Científica, devido à simplicidade dos objetivos e métodos, sendo desenvolvidos por alunos de graduação em estágios não curriculares ou em trabalhos de conclusão de curso (monografias). Sendo simples do ponto de vista científico, embora muito enriquecedor para o aluno que o desenvolve, esses trabalhos não são aceitos por revistas com bom fator de impacto. Isso é muito frustrante, pois ocorrem gastos de material de consumo e de tempo, na orientação dos alunos e correção desses trabalhos. Mesmo assim, ainda acho extremamente importante esse tipo de análise, pelo treinamento dos alunos e, de qualquer maneira, acabamos veiculando esses dados em revistas brasileiras de menor impacto e em eventos científicos no Brasil e, às vezes, até internacionais.

Em 2001, analisamos 100 amostras de mel, em relação à presença de esporos de *C. botulinum* em amostras de mel obtidas no estado de São Paulo e avaliamos a sua qualidade microbiológica, de acordo com a Portaria 367/97, vigente na época. Esse trabalho resultou no artigo **Rall et al. (2003)**.

O botulismo é uma enfermidade neurológica severa, causada pela neurotoxina de *C. botulinum*, que afeta seres humanos e uma variedade de animais. O tipo infantil foi reconhecido em 1976, como uma doença parálitica rara, causada pela ingestão de esporos viáveis que germinam e colonizam o trato intestinal infantil, com produção local e absorção da toxina de *Clostridium botulinum* (MASELLI, 1998; SCHOCKEN-ITURRINO et al., 1999). Diferentemente do clássico, não ocorre com características epidêmicas e é a forma mais notificada ao Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC)

Clostridium botulinum é a designação taxonômica de um grupo de bactérias anaeróbias, gram-positivas e formadoras de esporos (MIDURA, 1996). É classificado como uma espécie individual, mas consiste de pelo menos três grupos de organismos geneticamente distintos. Eles são semelhantes ao produzir neurotoxinas com atividades neurológicas similares, mas as características imunológicas são diferentes (SHAPIRO et al., 1998). As células vegetativas de *C. botulinum* são bastonetes Gram positivos, levemente curvos com esporos subterminais (MIDURA, 1996). Os esporos são resistentes ao calor e podem sobreviver à fervura por várias horas (ARNON et al., 1979).

Esse micro-organismo foi dividido em quatro grupos diferentes (I, II, III e IV), baseado em características fisiológicas. (HATHEWAY, 1990). Geralmente, os grupos I e II causam botulismo em humanos e o III, em animais, mas podem ocorrer exceções. O grupo IV ainda não foi associado à doença (SUEN et al, 1988).

O grupo I produz neurotoxinas tipos A, B ou F e o II, B, E ou F. A produção de duas toxinas ao mesmo tempo já foi reportada (FRANCIOSA et al., 1997; KIRMA et al., 2004). Em 2008, nos Emirados Arabes, Fathalla et al. descreveram o primeiro caso de botulismo por *C. Botulinum* produtor de toxina Ba, embora não tenha sido relacionado com o consumo de mel.

Fenotipicamente, os grupos I e II diferem em vários parâmetros. Os representantes do grupo I são encontrados mais frequentemente no solo de clima temperado, principalmente. As amostras que compõem o grupo II podem também ser encontradas em ambientes aquáticos, particularmente o tipo E. Além disso, esporos do grupo I apresentam maior resistência à temperatura, causando sérios problemas na indústria de enlatados (PECK et al., 1993; LINDSTROM et al., 2003). A diferenciação fenotípica é realizada com o auxílio do ágar caseína, que testa a atividade proteolítica, presente no grupo I, mas não no II (KETO-TIMONEN et al., 2005). Além de proteolítica, o grupo I é mesófilo e o II, não sendo proteolítico, é sacarolítico e psicrotrófico.

As neurotoxinas associadas a esse quadro são tipos A, B, Bf, E e F de *C. botulinum* (HATHEWAY; McCROSKEY, 1987; BARASH; ARNON, 2004). Já foram relatados casos relacionados com os tipos E e F, produzidos por *C. butyricum* (HATHEWAY; McCROSKEY, 1987) e *C. baratii* (BARASH et al., 2005; KEET et al., 2005), respectivamente. A maioria dos casos de botulismo

infantil ocorre devido à toxina botulínica tipos A ou B (MIDURA, 1996, FERNÁNDEZ; CICCARELLI, 1999).

O botulismo infantil pode causar constipação (freqüentemente este é o primeiro sinal), desatenção, letargia, dificuldade em sugar e engolir, choro fraco, hipotonia, fraqueza geral dos músculos e perda do controle da cabeça. Sintomas neurológicos podem incluir ptose, oftalmoplegia, reação vagarosa da pupila à luz, disfagia e tônus do esfíncter anal reduzido (MIDURA, 1996; BAM, 2012). A paralisia flácida do botulismo infantil manifestada por hipotonia ou fraqueza é um dos sintomas mais evidentes da doença. Vários estudos relataram que esse sintoma está presente em 88 a 100% dos pacientes (RICK et al., 1999). O espectro clínico do botulismo infantil varia desde portadores assintomáticos até a forma fulminante da doença, que em alguns casos pode se assemelhar à síndrome da morte súbita infantil (MIDURA, 1996).

Uma ligação entre o tipo fulminante de botulismo e a síndrome da morte súbita infantil (SMSI) foi observada na Califórnia devido à similaridade entre a interrupção respiratória de pacientes com essa doença e SMSI. Amostras a partir de necropsia de crianças que sofreram a SMSI foram testadas para a detecção do micro-organismo e de suas toxinas. *C. botulinum* foi encontrado em 10 de 211 casos de SMSI (4,9%) e a toxina botulínica foi detectada em 2 amostras desses 10 casos positivos. Na Suíça, toxinas de *Clostridium botulinum* tipos A, B, C, F e G foram isoladas de 9 entre 59 casos de SIDS (MIDURA, 1996).

Os alimentos já relacionados a esse tipo de botulismo são, principalmente, mel (AURELI et al., 2002) e leite em pó (BRETT et al., 2005; JOHNSON et al., 2005). Poeira e outros materiais ambientais também parecem ser importantes fontes de esporos (ARNON, 1992; NEVAS et al., 2005).

Segundo o BAM (2012), pesquisas apresentaram positividade de 13% para esporos de *C. botulinum* em amostras de mel, nos Estados Unidos. Por esta razão, desde 2001, a Administração de Drogas e Alimentos (FDA-Food and Drugs Administration), o Centro para Controle de Doenças (CDC-Center of Disease Control), e a Academia Americana de Pediatria recomendam que crianças com menos de um ano de idade não consumam este alimento. No Brasil, essa recomendação passou a existir, oficialmente, somente após

pronunciamento da Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA), através do Informe Técnico nº. 37, de 28 de julho de 2008 (BRASIL, 2008).

O mel é o único alimento comumente implicado na origem de botulismo infantil e esporos de *C. botulinum* estão presentes naturalmente em algumas amostras (MIDURA, 1996; SCHOCKEN – ITURRINO et al., 1999). ARNON et al. (1979) relataram que *C. botulinum* foi isolado de uma criança que ingeriu mel e desenvolveu botulismo infantil e o tipo de toxina (A e B) detectada no mel foi o mesmo tipo da toxina (A e B) responsável pela doença da criança.

Snowdon e Cliver (1996) realizaram uma revisão bibliográfica de vários artigos e do total de 2033 amostras testadas nesses estudos, 104 (5,11%) continham níveis detectáveis de esporos botulínicos, que normalmente são encontrados em taxas abaixo de 1 por grama de mel.

Na época desse trabalho, vigorava Portaria 367/97 (BRASIL, 1997), cujos padrões microbiológicos permitiam até 10^2 UFC/g de bolores e leveduras, na ausência de *Salmonella* spp e de *Shigella* spp em 25g e de coliformes totais/g.

Todas as 100 amostras foram negativas para a presença *Salmonella*, *Shigella* e coliformes totais e termotolerantes. Esporos de *C. botulinum* estiveram presentes em 3 amostras (3%) e bolores e leveduras em 64 (64%), mas somente 25 (25%) excederam os critérios microbiológicos estabelecidos, com contagens de até 10^5 UFC/g.

Pelos resultados obtidos, pudemos concluir que 25% das amostras de mel comercializadas no estado de São Paulo não estavam de acordo com a legislação, em relação à quantidade de bolores e leveduras. Embora a incidência de *C. botulinum* possa ser considerada baixa (3%), sugere que o mel do estado de São Paulo oferece riscos aos consumidores.

Em 2007, analisamos mais 200 amostras de mel (**FAPESP 2007/52532-5**). E, embora nessa época a Portaria 367/97 já tivesse sido revogada, sem ser substituída, continuamos a utilizar os mesmos parâmetros dessa lei, na ausência de padrões legais. Além disso, a Instrução Normativa Nº 3, de 19 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001b), que regulamenta outros produtos de origem apícola apresentou os mesmos padrões microbiológicos da extinta Portaria. Nesse trabalho, introduzimos técnicas de biologia molecular, na

tentativa de melhorar a sensibilidade das análises, além disso, o alvo dos *primers* utilizados eram os diferentes tipos de neurotoxinas, selecionando somente amostras contaminadas com *C. botulinum* neurotoxigênicos.

Novamente, as 200 amostras de mel foram negativas para a presença *Salmonella*, *Shigella* e de coliformes totais e termotolerantes. Em relação à contagem de bolores e leveduras, 118 amostras (59%) foram positivas, com contagem que variaram de 10^2 a $4,8 \times 10^5$ UFC/g de mel.

Das 200 amostras, 125 (62,5%) eram industrializadas e fiscalizadas por órgãos estaduais ou federais e o restante, adquiridas no comércio formal ou informal, mas sem rotulagem com informações sobre os dados do fabricante e data de validade, foram denominadas de “mel caseiro ou artesanal”. Dentre as 125 amostras de mel industrializado, 58 (46,4%) apresentaram algum grau de contaminação por bolores e leveduras, variando entre 10^2 até 10^5 UFC/g e a faixa onde ocorreu a maior contaminação foi a que variou entre 10^2 a 10^3 , com a porcentagem de 51,7%. Na contaminação do mel caseiro, o grau de contaminação foi maior, pois das 75 amostras, 60 (80%) revelaram-se positivas para a contaminação por esses indicadores, ocorrendo contaminação mais frequente, coincidentemente, na mesma porcentagem do mel industrializado (51,7%), mas na faixa entre 10^3 a 10^4 UFC/g. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($z= 3,640$; $p < 0,001$).

Foi verificada a presença dos genes *BoNT/A*, *BoNT/B*, *BoNT/E* e *BoNT/F*, resonsáveis pela produção das toxinas botulínicas A, B, E e F, as mais comumente envolvidas em botulismo humano. Pode-se observar que ocorreu a presença desses genes em 15 (7,5%) das 200 amostras de mel testadas, sendo 9 (60%) do tipo A e 6 (40%), do B. Não se verificou a presença simultanea de dois ou mais genes. Os amplicons das amostras positivas de *boNT/A*, *boNT/B* foram sequenciados e as sequencias parciais foram confirmadas no GenBank, acessos AB665554.1 e AB665558.1, respectivamente.

Entre as 9 amostras positivas para o gene *BoNT/A*, 5 (55,6%) eram provenientes de méis industriais e as 4 restantes (44,4%), de caseiros. Quanto ao *BoNT/B*, das 6 amostras positivas, essa distribuição foi de 50% para cada tipo de mel. A diferença da frequencia desses genes nas amostras de mel de

ambas as origens não foi estatisticamente significativa ($z= 1$ e $p= 0,681$, respectivamente.)

As amostras positivas para os genes das toxinas botulínicas apresentaram concentrações variadas de bolores e leveduras. Entre as 15 amostras positivas, 9 (60%) tinham contaminação na faixa de 10^3 UFC/g, 4 (26,7%), na faixa de 10^4 UFC/g e somente 2 (13,3%), em mais de 10^5 UFC/g.

Pela ausência de indicadores higiênico- sanitários como coliformes totais ou termotolerantes em todas as amostras analisadas e pela variação da presença de bolores e leveduras, independente da presença de *C. botulinum*, fica claro a ausência de um micro-organismo específico ou um grupo deles que indiquem a possível presença de *C. botulinum*. Assim, sua presença no mel, documentada nesse e em outros trabalhos, reforça a recomendação de que crianças menores de um ano não devem ingerir mel ou produtos que contenham essa matéria prima, como ingredientes, uma vez que o esse alimento não sofre nenhum processamento que possa eliminar os esporos presentes.

Em 2005, uma aluna de iniciação científica (Bolsa FAPESP 05/54282-0) desenvolveu parte de um trabalho que resultou na publicação do artigo **Moreira et al. (2009)**, onde 233 amostras de especiarias foram analisadas, entre pimenta do reino, cominho, oregano, cravo, canela, manjeriço, louro, salsinha e cebolinha, de 14 diferentes marcas.

Em todo o mundo, especiarias são usadas no preparo de alimentos, por possuírem propriedades aromatizantes, deixando as preparações mais saborosas (BANERJEE; SARKAR, 2003). Esse termo é aplicado a produtos naturais de origem vegetal, que podem ser comercializados em pó, inteiros ou fragmentados. A maioria não tem valor nutritivo, mas apresenta propriedades organolépticas, estimulando a secreção gástrica e aumentando o tônus e a motilidade dos órgãos digestivos (GERMANO; GERMANO, 1998).

Alguns condimentos possuem ação antimicrobiana, como o cravo, o orégano, a cebola, o alho e a páprica, entre outros. Arora e Kaur (1999) observaram que o cravo inibia moderadamente o crescimento de *Shigella flexneri*, efeito posteriormente confirmado por Bagamboula et al. (2003), que mostraram que aquela especiaria, bem como o manjeriço e o orégano,

realmente apresentavam efeito antimicrobiano. Outras especiarias como a cebola e o alho possuem dissulfidrídicos alifáticos, substâncias com atividade bactericida sobre *Salmonella* sp. e *E. coli* (FRANCO; BERGAMO, 1989). A despeito de sua ação antimicrobiana, tais condimentos não devem ser empregados em concentrações elevadas em preparações alimentícias com o intuito de diminuir sua carga microbiológica, já que podem alterar as características sensoriais do alimento.

Por outro lado, esses condimentos e ervas podem ser expostos a uma ampla carga de contaminação microbiana durante a colheita e o processamento. São quase sempre secos ao sol, espalhados em campo aberto e, em seguida, vendidos sem nenhum tratamento para reduzir a quantidade de micro-organismos. Além disso, podem ficar expostos em locais de venda pouco higiênicos, com elevada presença de poeira e até mesmo fezes de roedores, pássaros e insetos. (GARCÍA et al., 2001; BANERJEE et al., 2003). Assim, os condimentos podem ser um fator importante na contaminação de alimentos, pois podem ser usados em preparações que serão consumidas cruas ou que já tenham passado por um processamento térmico, representando um sério risco. Em países tropicais como o Brasil, fatores como a temperatura e umidade elevadas podem favorecer ainda mais o desenvolvimento de micro-organismos nas especiarias e alimentos em geral (GARCÍA et al., 2001; BANERJEE et al., 2003; RISTORI et al, 2007).

Vários patógenos já foram isolados a partir de especiarias como *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Shigella dysenteriae* e *Staphylococcus aureus*, (SEENAPPA; KEMPTON, 1981; GARCÍA et al., 2001; BANERJEE et al., 2003).

Pafumi (1986), na Austrália, relatou o isolamento de *Salmonella* em 8,2% das amostras de diferentes tipos de pimentas pretas analisadas em seu estudo. Segundo Santos et al. (1999), em um trabalho realizado com pimenta do reino preta no Brasil, 97,3% das 75 amostras analisadas estavam em desacordo com os parâmetros microbiológicos, sendo que *Salmonella* foi isolada em mais de 50% delas.

Na Argentina, Aguilera et al. (2005) analisaram 115 amostras de diferentes condimentos e observaram uma alta carga de contaminação por coliformes termotolerantes, sendo que 28 amostras (24,34%) apresentaram

contagens que variaram de 10^3 UFC/g até 10^8 UFC/g, principalmente as pimentas preta e branca e a páprica.

Foram analisadas 233 amostras de especiarias, sendo que 49 (21%) estavam fora dos padrões microbiológicos, em relação à quantidade de coliformes termotolerantes (Brasil, 2001a) e 13 (5,6%) pela presença de *Salmonella* spp.

Dos 9 tipos de especiarias avaliadas, a pimenta foi a que apresentou a maior contaminação, já que 12 (18,2%) das 66 amostras foram positivas para *Salmonella* sp., 1 (1,51%) estavam acima dos padrões para coliformes termotolerantes. Sobre esta especiaria, a literatura mostra trabalhos com resultados bastante diversos; Parfumi (1986) na Austrália e Santos et al. (1999), no Brasil, por exemplo, isolaram *Salmonella* respectivamente, em 8,2% e 50% das amostras analisadas.

Além da pimenta preta, *Salmonella* spp. foi isolada em cominho, em uma (6,7%) das 15 amostras analisadas. Em relação a os coliformes termotolerantes, 4 (26,6%) encontravam-se acima do padrão estipulado pela legislação (Brasil, 2001a).

Dos condimentos avaliados no presente estudo, o louro foi o que apresentou a melhor condição higiênico-sanitária. Nenhum dos microorganismos patogênicos pesquisados foi detectado e todas as amostras encontravam-se dentro dos padrões estipulados pela legislação em relação aos coliformes termotolerantes (BRASIL, 2001a). A canela também apresentou boa qualidade, pois somente uma amostra apresentou excesso de coliformes termotolerantes, na ausência dos patógenos pesquisados.

Das 15 amostras analisadas de salsinha desidratada, apenas uma apresentou contaminação por *B. cereus*, sendo que *Salmonella* não foi detectada em nenhuma delas. Cinco (33,3%) amostras estavam fora das especificações para coliformes termotolerantes. A cebolinha desidratada apresentou contaminação por *B. cereus* em 8,3% das amostras analisadas e não ocorreu contaminação por *Salmonella*. Duas amostras apresentaram valores acima do permitido para coliformes termotolerantes (16,6%). *S.aureus* não foram encontrados nestes condimentos.

Das especiarias avaliadas neste experimento, a pimenta preta e o cumim foram as que apresentaram a pior qualidade higiênico-sanitária,

evidenciada tanto pela presença de *Salmonella* sp., como pelas elevadas contagens de coliformes termotolerantes. Em termos gerais, portanto, o emprego de tais condimentos pelo consumidor, especialmente em alimentos prontos para o consumo, constitui um perigo à sua saúde. Medidas devem ser tomadas pelas indústrias produtoras para melhorar a qualidade desses produtos colocados à disposição do comércio varejista.

Em 2007, em outro trabalho de conclusão de curso, foram analisadas 50 amostras de horti-fruti minimamente processados, quanto à presença de *Salmonella*, enumração de *Staphylococcus aureus* e determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes. *Salmonella* não foi detectada em nenhuma das amostras, entretanto, 76% delas estavam fora das recomendações quanto ao número de coliformes termotolerantes, segundo legislação vigente (BRASIL, 2011a), cuja contaminação variou de <3 a $>1,1 \times 10^7$ NMP/g. *S. aureus* foi isolada de somente 1 (2%) amostra e em pequena concentração ($2,3 \times 10^2$ UFC/g). A partir dos dados obtidos, pode-se concluir que esses produtos apresentaram condições higiênico sanitárias insatisfatórias.

Numa monografia de 2007, que resultou no artigo **Rall et al. (20011)**, analisamos 70 amostras de peixes frescos ou congelados, comercializados na cidade de Botucatu. *Salmonella* sp. foi detectada em 3% das amostras de peixes frescos, não sendo observada nos congelados. Também foram pesquisados estafilococos coagulase positiva e coliformes termotolerantes. *Staphylococcus aureus* foi detectado em uma amostra de peixe fresco (3%), com contagem de 4×10^2 UFC/g. Em relação aos coliformes termotolerantes, das 70 amostras analisadas, 11 (15,7%) apresentaram esse indicador higiênico sanitário, cuja contaminação foi superior a $2,4 \times 10^3$ NMP/g. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que esses alimentos, potencialmente, representam perigo à saúde dos consumidores, pois apesar da maioria estar dentro dos parâmetros microbiológicos exigidos, uma amostra de peixe fresco apresentou *Salmonella*.

Em 2009, fizemos nova pesquisa, incluindo frutos do mar e entre as 100 amostras analisadas, nenhuma apresentou estafilococos coagulase

positiva e 2 foram positivas para *Salmonella* (2%), valores bem próximos aos obtidos 2 anos antes, de 3%. A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que, apesar ter ocorrido em poucas amostras, a presença de *Salmonella* é um fator de risco para a saúde dos consumidores, não devendo ser consumidos crus. Apesar de o congelamento ser uma boa maneira de conservação, este processo não elimina totalmente os patógenos do alimento.

Em 2009, desenvolvemos uma monografia muito interessante, que inclusive ficou em segundo lugar, entre os melhores trabalhos de graduação, na X Jornada da Nutrição de Botucatu.

O trabalho teve como objetivo a análise microbiológica de 30 amostras de leite tipo C, recém pasteurizados, comercializados em padarias e supermercados da cidade de Botucatu e a análise de uma amostra do mesmo lote, na data limite de validade, totalizando 60 amostras. A conservação do leite cru por longos períodos de tempo, sob refrigeração, pode levar à perda de sua qualidade, pela produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas por bactérias psicotróficas. Embora a pasteurização do leite elimine os patógenos, muitas dessas enzimas são termoestáveis, resistindo ao tratamento (SANTOS; FONSECA, 2004). Além disso, esse processo térmico pode ser realizado de maneira inadequada ou com uma matéria prima de qualidade microbiológica ruim, resultando em leite de baixa qualidade. Foi realizada a enumeração de *Staphylococcus aureus* e de bactérias psicotróficas e a pesquisa da presença de *Salmonella* sp., no momento da compra e data de validade dos produtos. Para a determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes, foram testadas mais 54 amostras em cada etapa (84 no total), para a obtenção de dados estatísticos.

Segundo a RDC nº 12 (BRASIL, 2001), o leite pode apresentar até 4 coliformes termotolerantes/ml, na ausência de *Salmonella*. *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* não foram detectados em nenhuma das 60 amostras analisadas (30 no dia da pasteurização e 30 na data de validade). Quanto ao NMP de coliformes termotolerantes, das 84 amostras de leite recém pasteurizados, 31 (36,9%) apresentaram esse indicador em excesso, segundo os parâmetros legais. Esse número passou para 53 (63,1%), quando as amostras foram analisadas na data limite de validade. Embora as bactérias

psicrotróficas não estejam contempladas na legislação, sua presença no produto final pode indicar falta de higiene ou falha de processamento térmico e, entre as 30 amostras analisadas na data de pasteurização e de validade, essas bactérias foram encontradas em 16 (53,3%) e 27 (90%) amostras, respectivamente. Frente aos resultados obtidos, pode-se concluir que, embora não tenha sido detectada a presença de patógenos, esse leite não deve ser consumido próximo à sua data de validade, pois podem ocorrer alterações organolépticas devido à presença de psicrotróficos e coliformes.

Em relação em alimentos prontos, uma aluna de iniciação científica (2009) analisou 102 amostras de alimentos servidos em 17 restaurantes do tipo *self-service*, todas com as 2 repetições por tipo de alimento. Os produtos à base de carnes, pescados, ovos e similares cozidos exigem a ausência de *Salmonella* em 25g e permitem até 2×10^6 /g de coliformes termotolerantes e até 10^3 /g de estafilococos coagulase positiva. Das 34 amostras de carnes coletadas 15 (31,3%) apresentaram excesso de coliformes termotolerantes, em concentrações que variaram de < 3 a $> 1,1 \times 10^6$ MNP/g. Porém nenhum dos patógenos analisados foi encontrado.

Pela RDC N°12, a ausência de *Salmonella* é exigida em todos os tipos de salada, porém outros parâmetros podem variar, dependendo do preparo. Entre as amostras de saladas cruas, 17 (73,9%) apresentaram coliformes termotolerantes acima do permitido, segundo os padrões da RDC (10^2 /g). Saladas cozidas podem apresentar até $5,0 \times 10^3$ desse indicador e até 10^3 de estafilococos coagulase positiva e, entre as quatro amostras analisadas, todas estavam além do valor permitido, quanto à determinação de coliformes termotolerantes. Quanto às saladas acrescidas de molho de maionese, das sete amostras de diferentes restaurantes, seis (85,7%) apresentaram coliformes acima de 10^2 NMP/g. A Resolução permite até 10^3 de estafilococos coagulase positiva, porém *S. aureus* não foi detectado. Assim, de 34 amostras de saladas, 28 (82,3%) apresentaram coliformes termotolerantes acima dos valores permitidos, em concentrações maiores a $> 1,1 \times 10^6$ NMP/g

Em relação a massas, a ANVISA estabeleceu, para pratos à base de cereais, farinhas, grãos e similares, até 10^2 de coliformes termotolerantes, ausência de *Salmonella* e até 10^3 de estafilococos coagulase positiva. Das 34

amostras de massas analisadas como, espaguete, lasanha, capeleti, entre outros, 13 (38,2%) estavam fora do padrão quanto ao limite de coliformes, em concentrações que variaram de <3 a $>1,1 \times 10^6$ NMP/g.

Resultados surpreendentes foram observados numa monografia concluída em 2011, onde pesquisamos a qualidade higiênico- sanitária de garapas comercializadas em Botucatu e região.

O estado de São Paulo é o maior produtor de cana de açúcar do Brasil, com aproximadamente 346 milhões de toneladas na safra de 2008/2009 (ÚNICA, 2012). Essa grande produção, associada ao clima quente, favorece o comércio de caldo de cana na grande maioria das cidades do interior do estado. A contaminação por parasitas geralmente ocorre durante sua produção no campo e a por bactérias patogênicas está mais relacionada à contaminação pelos manipuladores, equipamentos (moedores) e utensílios utilizados na extração do líquido. Tendo em vista a falta de dados em Botucatu e região, o objetivo do presente estudo foi analisar 50 amostras de garapa, quanto às exigências microbiológicas da RDC Nº12 (determinação do Número Mais Provável de coliformes termotolerantes e pesquisa da presença de *Samonella sp*), além da presença de *Staphylococcus aureus* e *Trypanosoma cruzi*. *Samonella sp.*, *Staphylococcus aureus* e *Trypanosoma cruzi* não foram isolados, entretanto, 82% das amostras apresentaram contaminação superior à permitida por coliformes termotolerantes, demonstrando condições inadequadas para a comercialização desse produto e também a falta de higiene por parte dos vendedores.

Esses dados são alguns exemplos dos trabalhos desenvolvidos que enfocam, principalmente, a avaliação da qualidade higiênico-sanitária de vários alimentos. Os resultados são preocupantes, pois ao longo dos anos, pudemos notar que a qualidade microbiológica dos alimentos não vem melhorando, ao contrário, estão cada vez pior, a despeito dos esforços das indústrias envolvidas e do governo.

II. MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

2.2. *Staphylococcus* spp

Doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados por micro-organismos infecciosos e toxigênicos ainda são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (ANGELILLO et al., 2000).

Mesmo em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, onde os alimentos apresentam boa qualidade microbiológica, estima-se que anualmente 76 milhões de pessoas sejam acometidas por algum tipo de doença de origem alimentar, com 325.000 hospitalizações e 5.200 mortes. Em 14 milhões de pacientes pode-se confirmar a participação de agentes patogênicos através de diagnósticos laboratoriais, responsabilizando-os por 60.000 hospitalizações e 1.800 mortes (FDA, 2002; LAMPS, 2003). Considerando também os casos, não relatados e não diagnosticados, estima-se que o número de doentes supere 80 milhões e custem ao país entre cinco e 17 bilhões de dólares todos os anos, incluindo gastos com tratamento médico e ausência dos doentes às atividades profissionais (ANDERSON et al., 2004; FRENZEN, 2004).

A variedade de alimentos em que *S. aureus* já foi detectado é grande, porém os mais comumente associados à intoxicação alimentar são carnes (bovina, suína e de aves), produtos cárneos industrializados (presunto, salame, salsicha), leite cru, queijo feito de leite cru e/ou muito manipulados durante a produção, produtos lácteos, saladas e doces (HALPIN-DOHNALEK; MARTH, 1989; DOWNES; ITO, 2001).

2.2.1. Características Gerais

Os *Staphylococcus* pertencem à família Staphylococaceae, são cocos Gram positivos, medindo de 0,8 – 1,0 μm , que se dividem em mais de um plano formando cachos irregulares tridimensionais, esses micro-organismos são imóveis, produzem catalase e são anaeróbios facultativos (ICMSF, 1996, EUZÉBY, 2012). Esse gênero está subdividido em 47 espécies (71 sub-

espécies), (DSMZ, 2012) que se dividem de acordo com a síntese ou não da enzima coagulase, sendo a maioria, coagulase-negativa, com exceção do *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* (BANNERMAN et al. 2003, KWOK; CHOW, 2003). Entretanto, deve ser ressaltado o isolamento de uma nova espécie, *S. agnetis*, que apresenta coagulase variável (TAPONEN et al., 2012). Segundo os autores, após análises da sequência dos genes 16rRNA, *rpoB* e *tuf* e análise por AFLP (amplified fragment length polymorphism), as espécies filogeneticamente mais relacionadas são *S. hyicus* e *S. chromogenes*.

Entre os *Staphylococcus*, a espécie *S. aureus* é considerada a mais importante em função da sua alta patogenicidade ao homem, podendo ser encontrada nas narinas anteriores de 20 a 50% dos adultos, bem como, em pregas cutâneas, períneo, axilas, áreas inguinal e perineal (VON EIFF et al., 2001). Essa espécie é halo-tolerante, multiplicando-se em concentrações de até 15% de cloreto de sódio e em baixa atividade de água (0,85), se as outras condições de crescimento estiverem ótimas. Crescem em uma ampla faixa de pH (4,2 a 9,3) e em temperaturas de 7 a 48°C. O micro-organismo é resistente à dessecação, ao congelamento e sobrevive a temperaturas iguais ou menores que - 20°C, porém é prontamente destruído pela pasteurização e cocção normais. Suas toxinas permanecem estáveis ao congelamento e são extremamente resistentes ao calor, não sendo inativadas em processos de esterilização de alguns alimentos enlatados e em radiação ionizante e não ionizante (HALPIN-DOHNALEK; MARTH, 1989). As toxinas também são resistentes às enzimas proteolíticas, como tripsina, quimiotripsina, pepsina e papaína, permitindo sua passagem pelo estômago sem perda da atividade, chegando ao intestino, onde estimula a emese e diarreia (BRYAN, 1980).

De acordo com Bannerman et al. (2003), cerca de metade das espécies de estafilococos coagulase-negativa (ECN) é constituinte da microbiota normal de pele e mucosas do homem, destacando-se dentre eles, o *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. saccharolyticus*, *S. auricularis*, *S. caprae*, *S. lugdunensis* e *S. schleiferi*, podendo atingir de 10^3 a 10^6 UFC/cm² na superfície de regiões mais úmidas do corpo. Algumas espécies mostram marcante preferência por certos habitats, como o *S. capitis* que é encontrado

em grandes concentrações em áreas da cabeça como testa, sobrancelha e canal auditivo externo (KLOOS; BANNERMAN, 1994). De acordo com Kloos e Scheifer (1983), *S. auricularis* é uma das espécies mais isoladas no canal auditivo externo de humanos. *S. caprae* e o *S. xylosus* são ocasionalmente isolados da pele de humanos, embora estejam amplamente distribuídos na natureza. *S. saprophyticus* é geralmente encontrado em baixas concentrações e transitoriamente em vários sítios anatômicos do corpo humano, porém, apresentando aderência específica às células urogenitais (SCHLEIFER; KLOOS 1975). *S. hominis* e *S. haemolyticus* colonizam regiões mais secas da pele e são também encontrados em grande número nas regiões mais úmidas; ao contrário do *S. warneri* e o *S. lugdunensis* que são observados geralmente em baixas concentrações, embora distribuídos por todo o corpo. *S. epidermidis* é a espécie predominante em humanos, isolado em grande número nas narinas anteriores, axilas, área inguinal e perineal (KLOOS; MUSSELWHITE, 1975).

2.2.2. Enterotoxinas de *Staphylococcus* sp.

Intoxicação alimentar estafilocócica (estafilotoxicose; estafiloenterotoxemia) é o nome da condição clínica causada pelas enterotoxinas produzidas por algumas linhagens de *S. aureus*. Os sintomas ocorrem entre 2 e 4 horas após a ingestão da toxina pré formada no alimento e os mais comuns são vômito, náuseas, dores abdominais e diarreia (HALPIN-DOHNALEK; MARTH, 1989). Alguns indivíduos podem não apresentar todos os sintomas associados à doença, e em casos mais graves, dor de cabeça, contrações musculares e mudanças transitórias na pressão sanguínea e na pulsação podem acontecer. Os casos de óbito são raros, embora a reposição de eletrólitos possa ser necessária para compensar a perda de fluídos pela diarreia e vômito. Porém, existem registros de morte por intoxicação estafilocócica entre idosos, crianças e pessoas severamente debilitadas (HALPIN-DOHNALEK; MARTH, 1989; ICMSF, 1996, CARMO et al., 2004). Embora 0,1 – 1,0 µg/kg da toxina possa causar sintomas em humanos, o tempo de aparecimento e a severidade dos sintomas dependem da quantidade de toxina ingerida e da susceptibilidade do indivíduo. Devido à curta duração

dos sintomas, poucos casos são reportados e somente surtos que envolvem grande número de pessoas ganham atenção das autoridades (BRYAN, 1980; ICMSF, 1996).

Segundo Tranter (1996), a quantidade mínima de enterotoxina necessária para causar a doença não é conhecida, mas a ingestão de, pelo menos, 1 µg de toxina em 100g de alimento já induz o aparecimento de sintomas clínicos e este nível de toxina é alcançado quando a população de *S. aureus* excede 10⁵ UFC por grama. De acordo com Balaban e Rasooly (2001), a dose mínima de enterotoxinas ingerida para a ocorrência desses sintomas é menor, de 10 ng.

As enterotoxinas estafilocócicas clássicas são exoproteínas hidrossolúveis, com peso molecular de 26 a 29 KDa, caracterizadas por uma ponte dissulfeto, próximo ao centro da molécula. Os cinco tipos sorológicos clássicos foram identificados e designados pelas letras A, B, C, D e E (BERGDOLL; ROBBINS, 1973). Apresentam grandes quantidades de lisina, ácido aspártico, glutâmico, tirosina, dois resíduos de triptofano e cistinas, formando a cisteína, à qual, provavelmente, se atribui o sítio de toxicidade. A composição dos aminoácidos das toxinas A, D, E, B, C₁, C₂ e C₃ são semelhantes (BERGDOLL, 1989). Entretanto, entre essas enterotoxinas, os tipos A, D e E compartilham uma maior seqüência de homologia (53 a 81%) enquanto B e C apresentam homologia de 50-66% (STILES; KRAKAUER, 2005).

As enterotoxinas estafilocócicas são consideradas superantígenos, que se caracterizam por ligações simultâneas ao Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH) de classe II na célula apresentadora de antígeno e aos receptores de células T, sem a presença de antígenos específicos. Com essa ligação, ocorrem efeitos sistêmicos como febre alta, vômito, diarreia e disfunções hepáticas e renais (FERNANDEZ et al., 2006).

A enterotoxina estafilocócica do tipo A (SEA) é a mais comumente implicada nos casos de intoxicação alimentar. O gene *entA* é composto por 771 pares de base e carregado por um bacteriófago temperado (BORST; BETLEY, 1994). A toxina é produzida na fase exponencial de crescimento e, ao contrário das enterotoxinas tipos B, C e D, não tem sua produção regulada pelo gene acessório *agr* (TREMAINE et al., 1993).

O gene *entB* regula a produção da enterotoxina do tipo B (SEB), que apresenta, aproximadamente, 900 nucleotídeos (JOHNS; KHAN, 1988). Esse gene pode estar integrado ao DNA bacteriano, no caso de amostras clínicas ou carregado por um plasmídeo de 750Kb, em amostras de outras origens (SHALITA et al., 1977; SHAFER; IANDOLO, 1978).

O grupo da toxina C (SEC) é formado por três subtipos antigenicamente distintos e denominados de SEC1, SEC2 e SEC3. Esses tipos apresentam estrutura protéica altamente preservada, onde o SEC3 tem homologia de 98% na seqüência de nucleotídeos, em relação a SEC1. O SEC3 difere da SEC2 e SEC1, por 4 e 9 aminoácidos, respectivamente (COUCH; BETLEY, 1989). Segundo Marr et al. (1993), a enterotoxina C é heterogênea e apresenta variações antigênicas e em sua seqüência molecular, ocorrendo ainda, as variantes SEC bovina e SEC ovina, cuja classificação é baseada em diferenças antigênicas e no animal hospedeiro da qual foi isolada.

A enterotoxina estafilocócica tipo D (SED) é o segundo tipo mais comum, associado a casos de intoxicação alimentar. O gene responsável por essa toxina é o *entD*, estando localizado no plasmídeo PIB 485 (BAYLES; IANDOLO, 1989).

O gene para a enterotoxina E (SEE) é o *entE* e codifica uma proteína de 29 Kda, que apresenta grande seqüência homóloga com SEA, de 81% (VAN de BUSSCHE et al., 1993). Assim como a SEA e SEP, este gene também é carregado por um fago (BAYLES; IANDOLO, 1989)

Em 1992, Betley et al. caracterizaram a toxina G e Ren et al. (1994), sequenciaram o gene da toxina H. Su e Wong (1995) purificaram uma toxina emética com a mesma seqüência dos N-terminal da toxina H, porém sem a capacidade de induzir vômito. A enterotoxina estafilocócica tipo G (SEG) é codificada pelo gene *entG*, constituída por 233 aminoácidos e apresenta similaridade com SEB (39,1%) e SEC (37,8%), embora esteja mais intimamente relacionada ao superantígeno estreptocócico A (SSA) e com a enterotoxina pirogênica A de *Streptococcus* (SPEA), apresentando 41,6 e 40,3% de similaridade, respectivamente (MUNSON et al., 1998). Mempel et al. (2003) observaram que os genes para as toxinas G, I, M, N e O pertencem ao mesmo *cluster* e a detecção de um desses genes, geralmente indica a presença dos outros quatro.

A toxina tipo H (SEH) apresenta massa molecular de 27,3 Kda e homologia de apenas 36-38%, em relação aos outros tipos (SU; WONG, 1995), embora a enterotoxina tipo I (SEI), codificada pelo gene *entI* apresente a menor homologia entre as enterotoxinas, apresentando 218 nucleotídeos, junto com a SEG, ambas têm a capacidade de causar resposta emética e proliferação de células T, com produção de Interleucina II e Interferon gama (MUNSON et al., 1998). A enterotoxina tipo J (SEJ) é carregada pelo mesmo plasmídeo que a SED e os 269 aminoácidos que constituem a SEJ apresentam similaridade de 64-66%, em relação a SEA, SEE e SED (ZHANG et al., 1998). Recentemente, SEI tem sido agrupada com SEL, SEK, SEM e SEQ, baseado nas seqüências de homologia (ORWIN et al., 2003).

Mais recentemente, várias outras toxinas têm sido descritas e seus genes seqüenciados, sendo nomeadas como enterotoxinas K, L, M, N, O, P, Q, R e U (JARRAUD et al., 2001; KURODA et al., 2001; ORWIN et al., 2001 e 2003; LETERTRE et al., 2003; OMOE et al., 2003). Porém, até o momento, a relação entre as novas enterotoxinas e intoxicações de origem alimentar ainda não está completamente esclarecida, pois a maior incidência desses genes foi observada a partir de isolados clínicos ou cepas de coleções de cultura (OMOE et al., 2002; BECKER et al., 2003).

Essas novas enterotoxinas tem sido designadas como membros da família das enterotoxinas estafilocócicas baseadas na sequencia de similaridade com as enterotoxinas clássicas. O Cômite internacional de Nomenclatura para Superantígenos de *Staphylococcus* (INCSSN) recomendou que somente superantígenos que induzam emese por administração oral em experiências utilizando primatas sejam chamadas de enterotoxinas, enquanto outras toxinas relacionadas, mas que não causam emese nesse modelo experimental sejam designadas como “enterotoxina estafilocócica semelhante a superantígeno” (staphylococcal enterotoxin-like (Sel) superantigens) (LINA et al., 2004). Baseando-se nas recomendações do INCSSN, as toxinas SEJ, SEK, ..., SEU deveriam ser renomeadas como SEIJ, SEIK, ..., SEIU, respectivamente (OMOE et al, 2005). Com exceção de SEH, SEI e SEG, que já apresentaram atividade emética (SU; WONG, 1995; MUNSON et al., 1998), o envolvimento das outras SEI em surtos de origm alimentar ainda não está totalmente esclarecido.

Existem poucos estudos sobre intoxicação estafilocócica envolvendo essas novas enterotoxinas (AKINEDEM et al., 2001; ROSEC; GIGAUD, 2002), em contraste com a extensa literatura sobre surtos causados pelas cinco enterotoxinas clássicas (AKINEDEN et al., 2001; FUEYO et al., 2001; HOLECKOVA et al, 2002, ROSEC; GIGAUD, 2002; ERCOLINI et al, 2004).

Outras espécies de *Staphylococcus*, como *S. hycus*, *S. intermedius* e vários estafilococos coagulase negativa (ECN) também têm sido envolvidos em casos de intoxicação alimentar (KHAMBATY et al., 1994; UDO et al., 1999). Esses últimos autores isolaram ECN de manipuladores em 50 restaurantes na cidade do Kuwait e 6% das cepas apresentaram a presença de uma ou mais enterotoxinas clássicas, sendo a mais freqüente, a do tipo B. A produção de enterotoxinas por ECN também foi estudada por Vernozy - Rozand et al. (1996), que observaram a produção de enterotoxina do tipo E em cepas de *S. simulans*, *S. equorum*, *S. capitis*, *S. lentus*, *S. gallinarum* e *S. xylosus*, isoladas de leite e derivados.

2.2.2.1. Enterotoxinas de *Staphylococcus* sp. em alimentos

Intoxicação por *S. aureus* é a segunda causa mais freqüente de doenças de origem alimentar, depois de *Salmonella* e em números similares ao *Clostridium perfringens*. Na França, em 1997, *S. aureus* foi identificado como o agente etiológico em 569 de 1142 casos registrados de intoxicações. Os casos não esclarecidos podem ser explicados pela presença de outros estafilococos, coagulase positiva ou negativa, ou pela produção de outras enterotoxinas, que não as clássicas (ROSEC; GIGAUD, 2002; MARTIN et al., 2004). Desde 1987, Kokan e Bergdoll estimavam que 5% das intoxicações de origem alimentar causadas pelos estafilococos ocorreram devido a enterotoxinas não caracterizadas. Segundo Halpin-Dohnalek e Marth, (1989) cepas de *S. aureus* isoladas de aves produzem, quase que exclusivamente a toxina D, e poucas produzem toxina A ou ambas.

Em Valência, na Espanha, das 131 amostras isoladas de alimentos (produtos a base de carne, tripas de porco, carne de peixe, patê, bolos, etc.), 40 foram produtoras de enterotoxinas, sendo 60% das amostras de *S. aureus* e

40% de estafilococos coagulase-negativa (*S. epidermidis*, *S. sciuris*, *S. lentus*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*). As toxinas clássicas encontradas com maior frequência foram a SEC (22 amostras), SEA (11 amostras), SED (01 amostras), SEA + SEC (03 amostras); não sendo verificada a produção da toxina SEB e SEE (PINTO et al., 2005).

Em 1996, em um estudo realizado no sul da França, foram isoladas 213 cepas de *Staphylococcus aureus* e 51 de outras espécies de estafilococos, presentes em diversos alimentos, sendo 65 e 9 dos isolados produtores de enterotoxinas, respectivamente. Na pesquisa para produção de enterotoxinas clássicas, foram encontradas as frequências de 66% para SEC e 20,1%, 15,4%, 7,6% para SED, SEA, SEB respectivamente (ROSEC et. al, 1997).

Rosec e Gigaud (2002) testaram 258 cepas de *S. aureus* e a presença dos genes das toxinas clássicas ocorreu em 76 das 258 cepas de *S. aureus*, enquanto que os das toxinas G, H, I e J foram detectados em 147 isolados. Esses resultados aumentam a porcentagem de *S. aureus* enterotoxigênicos ou potencialmente enterotoxigênicos, entre as amostras isoladas de alimentos, uma vez que 30% das cepas apresentaram genes para as toxinas clássicas e 57%, para as novas. Os genes dessas toxinas foram encontrados em 45,6% dos *S. aureus* isolados de frangos e em 8%, de bovinos. As cepas isoladas de derivados do leite apresentaram esses genes em porcentagem maior do que as enterotoxinas clássicas, 48% e 12%, respectivamente. Os genes das enterotoxinas, independente do tipo, foram mais frequentemente encontrados em amostras de origem humana, mas a distribuição desses genes foi surpreendente, pois os genes para SEG e SEI foram os mais frequentes, estando presentes, associados ou não, em 80,6% das 155 cepas positivas para alguma das toxinas. Entre as SE clássicas, o tipo C foi o mais comum (45 cepas). Foram observadas seis associações diferentes entre as SE, sendo as mais frequentes, SEG +SEI (41,9%) e SEC+ SEG + SEI (24,5%). O gene SEG foi sistematicamente associado com o SEI, assim como o SED com o SEJ.

Nesse mesmo ano, Omoe et al. (2002) pesquisaram a distribuição das enterotoxinas clássicas e das “novas”, isto é, tipos G, H e I em 146 cepas de *S. aureus* isolados de diferentes origens e 113 (77,4%) foram positivas para um ou mais genes produtores de enterotoxinas (15 para somente um e os 98 restantes para um ou mais). Foram isoladas 71 cepas a partir de indivíduos

com intoxicação alimentar, das quais 66 (93%) foram positivas para os genes pesquisados, mas somente 54 (76,1%), para as enterotoxinas clássicas e, novamente, o tipo A foi o mais encontrado (47,9%). Os tipos B, D e G, isoladamente, foram observados duas vezes e o tipo H, seis vezes. Foi notada uma grande frequência da união de SEB+SEH (18 isolados).

Em 2004, Chen et al. testaram cepas de *S. aureus* de origem humana e de alimentos. Os genes para as toxinas clássicas e para as novas (SEG – SEI) foram pesquisados em 171 cepas isoladas de fezes de pacientes com intoxicação de origem alimentar e 116 foram positivas para as toxinas clássicas, mas 8 das 55 cepas negativas apresentaram uma das novas toxinas (15%). Diferentemente de Rosec e Gigaud (2002), estes autores observaram a presença isolada dos genes para as toxinas SEG e SEI. Nas 139 amostras isoladas de alimentos, o gene da SEA foi o mais encontrado, seguido pelo SEB. A SEA também foi a enterotoxina mais comumente ligada aos tipos SEG, SEH ou SEI.

Na Coreia do Sul, Kwon et al. (2004) pesquisaram a presença das enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ) em abatedouros de aves e suínos. Foram isoladas 141 amostras de *Staphylococcus aureus* distribuídas em retalhos de carne de porco e frango (23 e 42 amostras isoladas, respectivamente) e após lavagem das carcaças no final da matança (37 e 39 amostras isoladas de suínos e frangos, respectivamente). No abatedouro de suínos, 39% das amostras de retalhos de carne foram positivas para produção de enterotoxinas, sendo encontradas SEA (01), SEI (08) e após lavagem das carcaças, SEA (05), SEI (10) e SEA+SEI (02). No abatedouro de aves, foi encontrada apenas uma cepa positiva para enterotoxina SEH, não sendo encontrada após lavagem das carcaças. Concluiu-se que os tipos de enterotoxinas variam de acordo com os países pesquisados, sabendo-se que as mais comumente encontradas em alimentos contaminados são as toxinas clássicas e que os produtos cárneos geralmente são contaminados no processamento.

Em um estudo realizado em diversas regiões da Itália pesquisando estafilococos coagulase-positiva em produtos de origem animal comercializados em supermercados e amostras de superfícies de contato com alimento, durante o ano de 2000 a 2002, totalizando 11.384 amostras, foram

encontradas 1971 (17%) cepas de estafilococos coagulase-positiva. Destas 537 cepas foram identificadas como *S. aureus*, sendo 298 (55,5%) produtoras de enterotoxinas. As mais comumente encontradas foram: SEC (33,9%), SEA (26,5%), SEA+SED (20,5%), SED (13,4%), SEB (2,7%), SEA+SEB (1,7%), SEC+SED (0,7%), SEA+SEC (0,3%), SEB+SEC (0,3%) (NORMANNO et al., 2005).

S. aureus foi detectado em Milão, na Itália, em 96% do total de amostras de leite cru e de queijo produzido a partir de leite bovino e de cabra. A partir dos isolados, foram pesquisadas a produção das enterotoxinas SEA, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEL, obtendo-se 52 (56%) amostras positivas. As mais comumente encontradas, provenientes de leite bovino foram a SEA com 14 amostras, SED+SEJ, SEA+SED+SEJ com 06 e 18 amostras respectivamente, sendo que apenas uma amostra de queijo foi produtora de toxina para SEA. Quanto às amostras de leite, 18 (19,4%) foram positivas para a produção de toxina sendo 14 destas produtoras SEC+SEL e uma amostra de queijo produtora de SEA (CREMONESI et al., 2005).

Bania et al. (2005) identificaram 50 cepas de *S. aureus* em 108 amostras de carne crua fatiada e salsicha crua, sendo 54% (27) positivas para produção de enterotoxinas. Em nove cepas foi detectada a presença das toxinas clássicas (SEA-SEE). A toxina observada com maior frequência foi a SEH, encontrada em 14 cepas. Todas as cepas positivas para SEG e SEI foram acompanhadas por SEM e SEN e, às vezes, SEO. Entre as toxinas novas SEK, SEL, SEQ, SEP foram encontradas uma amostra para SEK acompanhada de SEQ, duas amostras para SEL, uma amostra para SEL + SEC e oito amostras para SEP, sendo uma acompanhada de SEC + SEL.

Nesse mesmo ano, Omoe et al. (2005) descreveram a detecção de 18 tipos de genes das enterotoxinas estafilocócicas (*sea - see, seg - ser, tsst*) em 69 cepas de *S. aureus* obtidas a partir de 30 surtos de origem alimentar (amostras de alimentos e clínicas) e 97 amostras coletadas de fossas nasais de pacientes no Japão, de 2000 a 2004. Todas as amostras foram positivas para, pelo menos, um genes. O gene *sea* esteve presente em 40 (58%) isolados, sendo que a maioria dessas cepas também carregou outro tipo de enterotoxina. As principais combinações foram entre *sea-seb-seh-sek-seq* com 21 isolados, seguidos *sea-seh-sek-seq*; *sea-seg-sei-sem-sen-seo*; *sea-sed-sej-*

ser, com 5, 4, 2 isolados respectivamente. Das 97 amostras de fossas nasais 77 (79,4%) foram positivas para a presença dos genes responsáveis pela produção de enterotoxinas, porém contrastando com os isolados de alimentos, somente 8 (8,3%) cepas foram positivas para o gene *sea* e suas associações. Os isolados mais comumente encontrados foram *seg-sei-sem-sen-seo*, *sed-seg-sei-sej-sem-sen-seo-sep-ser*, *seb-sep*, *seb-seg-sei-sem-sen-seo*, *seg-sei-seh-tsst*, com 16, 9, 7, 6 e 6 isolados, respectivamente.

Boerema et al. (2006) realizaram um estudo, na Nova Zelândia, comparando o perfil enterotoxigênico de uma coleção de cultura de 90 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas a partir de 21 amostras de fossas nasais, couro, carcaça, cortes de carne de bovinos, 27 de fossas nasais, carcaça, cortes de carne de ovinos, 26 de fossas nasais, olhos, feridas e furúnculos de humanos e 16 de alimentos contaminados (leite mastítico, torta de nata, presunto), sendo identificadas 61 (67,7%) amostras positivas para genes responsáveis pela produção de enterotoxinas (*sea* a *seo*), das quais 40 (44,4%) foram positivas apenas para as toxinas clássicas. As cepas isoladas das amostras humanas apresentaram uma maior incidência para esses genes (80,7%), comparadas com as isoladas de bovinos (61,9%) e de ovinos (63,0%). O gene mais comumente encontrado foi *seb*, presente em 12 cepas, seguidas pela *seh*, *sec*, *sea* e *see* com 9, 7, 4, 2, respectivamente. Em amostras onde houve a presença de mais de um gene simultaneamente, o mais encontrado foi a *seo* carregada com 5 variações (*sec*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen*). As novas toxinas (*seg* a *seo*) estavam presentes em 66,6% das amostras.

Na Alemanha, Atanassova et al. (2005) verificaram a prevalência de *Staphylococcus aureus* e a presença dos genes produtores de enterotoxinas (SEA a SED) durante a fabricação de presunto defumado em 135 amostras coletadas em três pontos distintos da planta de processamento. Foram isoladas 24 cepas possuidoras desses genes, sendo 57,1% em carne crua, 0,8% em carne salgada e 37,5% em defumada após salga. O gene mais comumente encontrado foi *sea* (50%) seguida pela *sec* (25%) e pela *sea+sec* (12,5%), não sendo encontrada *sed*. No mesmo ano, Fueyo et al. testaram 269 cepas de *S. aureus* isoladas de fossas nasais de manipuladores de alimentos e 57 apresentaram pelo menos uma das enterotoxinas clássicas, sendo os tipos A e C, as mais comuns, com 26 isolados cada (9,7%).

Hanashiro et al. (2001) analisaram a qualidade microbiológica de alimentos comercializados nas ruas da cidade de São Paulo – SP. Foram coletadas 40 amostras de produtos dos vendedores ambulantes localizados próximo ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina – USP. Os resultados das análises mostraram que a incidência de *S. aureus* foi de somente 2,5%. Porém, esse índice pode aumentar em períodos mais quentes do ano, levando a um grande risco aos consumidores de comida de rua.

Um trabalho objetivando avaliar as condições higiênico-sanitárias de tortas e doces comercializadas no município de Lavras – MG foi realizado por Boari et al. (2001), em que 20 amostras foram analisadas e 50% delas apresentaram-se fora do padrão quanto ao número de *Staphylococcus* coagulase positiva, com contagens variando de $1,5 \times 10^3$ a $3,6 \times 10^7$ UFC/g, indicando a falta de higiene na elaboração das tortas e/ou condições inadequadas de exposição e comercialização. Os números elevados encontrados em algumas amostras poderiam ser suficientes para produzir toxinas.

Carmo et al (2003) verificaram 2 surtos relacionados a cepas de *S. aureus* enterotoxigênicos em Manhuaçu e Passa-Quatro, MG, Brasil. No primeiro surto, 50 indivíduos ficaram doentes pelo consumo de queijo Minas e, no segundo 328 indivíduos foram afetados após consumirem leite cru. As enterotoxinas específicas encontradas em cada surto levaram a concluir que a contaminação do primeiro surto estava relacionada com os manipuladores de alimentos, e o segundo, com mastite bovina. Em 2003, os mesmos autores relataram outro surto de intoxicação alimentar relacionada ao *S. aureus*, envolvendo 42 pessoas que se alimentaram num restaurante em Passos, MG, Brasil. Os resultados dos estudos apontaram que os manipuladores de alimentos teriam sido os causadores da contaminação da comida, pois eram portadores desse micro-organismo.

Em 2003, pela primeira vez no nosso laboratório, além da detecção de *S. aureus*, também pesquisamos a produção das enterotoxinas clássicas pelo método de aglutinação reversa passiva em látex (RPLA), em um trabalho de Iniciação Científica (FAPESP 00/00949-0). Esse trabalho resultou no artigo de **Alegro-Aragon (2007)**, onde 172 amostras de sobremesas, sanduíches e

salgados foram analisadas quanto a enumeração de *Staphylococcus aureus*, que estavam presentes em 26 (15,1%) amostras. Neste trabalho *S. aureus* não foi isolado de iogurtes e queijos de baixa umidade. Foi encontrado em outras 26 amostras de alimentos (15,1%) e em 11, a concentração estava de acordo com a Legislação. Mesmo assim, pequenas concentrações não podem ser ignoradas, pois pode haver multiplicação e produção de toxinas, em condições adequadas.

Não foram detectadas toxinas diretamente no alimento. Esses resultados são esperados, uma vez que, das 26 amostras positivase, somente três (11,5%) apresentaram concentrações maiores a 10^5 UFC/g. Segundo Tranter (1996), são necessárias aproximadamente 10^5 UFC/g, para que ocorra produção de toxinas.

Foram isoladas 50 cepas de *Staphylococcus* a partir dos alimentos analisados e 27 (54%) foram capazes de produzir uma ou mais enterotoxinas, de acordo com a Tabela 1. Resultados semelhantes foram encontrados por Masud et al. (1993), que isolaram 85 cepas de *S. aureus* de produtos lácteos e observaram que 56,5% eram enterotoxigênicas e por Fernández e Rodríguez (1996), que verificaram 49% de enterotoxigenicidade nas cepas isoladas de queijos e cremes, no Chile. Valores um pouco menores foram apresentados por Adesiyun et al. (1998), que analisaram 175 amostras de leite integral e observaram que 42,9% das cepas isoladas eram produtoras de enterotoxinas.

De acordo com a Tabela 1, a toxina tipo C foi a mais freqüente, em associação ou não a outras enterotoxinas (59,2%). A do tipo A também foi muito freqüente, ocorrendo em 48,2% das cepas de *S. aureus* produtoras de toxinas. Rosec et al. (1997) observaram que 66% das cepas isoladas de produtos lácteos foram positivas para a toxina C. Por outro lado, Wieneke et al. (1993), estudando surtos de intoxicação, no Reino Unido, e Fernández e Rodríguez (1996), analisando queijos e cremes no Chile, encontraram maior freqüência da enterotoxina A (79% e 58,3%, respectivamente).

Tabela 1. Enterotoxinas clássicas produzidas pelas cepas de *S. aureus*, isolados de diferentes alimentos.

Tipo de alimentos	N	Enterotoxinas estafilocócicas						Total (%)
		A	B	C	D	A/C	B/C	
leite	1	-	-	-	-	-	-	0
queijo mole	11	-	-	4	-	1	1	6 (54,5)
sorvete	2	-	1	1	-	-	-	2 (100)
doce cremoso	24	6	1	3	-	2	-	12 (50)
salgado	12	3	-	2	-	1	1	7 (58,3)
Total N(%)	50	9 (33,4)	2 (7,4)	10 (37)	0	4 (14,8)	2 (7,4)	27

Em 2005, iniciamos a pesquisa de genes relacionados com a produção dessas enterotoxinas, resultando no artigo de **Rall et al. (2008)**, onde foram analisadas 54 amostras de leite *in natura*, 54 amostras de leite após pasteurização e o mesmo número de amostras, para serem analisado na data de validade, em cinco laticínios da região oeste do estado de São Paulo. Considerando-se as 54 amostras de leite cru dos cinco laticínios, *S. aureus* foi observado em 38 (70,4%) dessas amostras, em concentrações de até $8,9 \times 10^5$ UFC/ml. Em Minas Gerais, valores maiores foram observados por Arcuri et al. (2006), onde 22 (91,7%) de 24 amostras de leite cru apresentavam esse micro-organismo. Na Malásia, Chye et al. (2004) observaram valores semelhantes aos valores nesse trabalho, quanto à presença de *S. aureus*, onde 60,7% de 930 amostras de leite cru também estavam contaminadas.

Após o tratamento térmico, *S. aureus* foi observado em 8 (14,7%) das 54 amostras, em concentração de até $8,7 \times 10^3$ UFC/ml. Nas 54 análises de leite na data de validade, houve um aumento para 11 amostras (20,4%) do leite na data do vencimento, com concentração máxima de $8,7 \times 10^3$ UFC/ml.

Quanto às enterotoxinas de *S. aureus*, foram pesquisados os genes responsáveis pela produção das clássicas (A, B, C, D e E) e das descobertas mais recentemente (G, H, I e J). Os *primers* utilizados nesse trabalho geraram os produtos observados na Figura 1 (JOHNSON et al., 1991; MEHROTRA et al., 2000; OMOE et al., 2002; NASHEV et al., 2004).

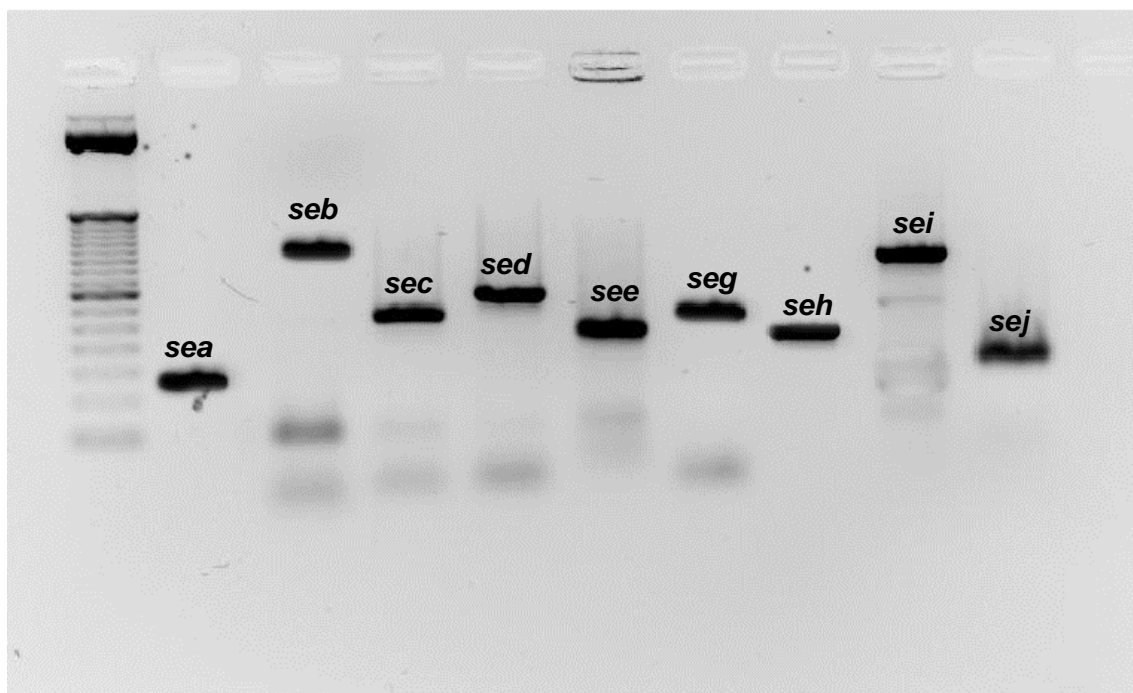


Figura 1. Gel de eletroforese do produto da PCR dos genes das toxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J de *Staphylococcus aureus*. ATCC 13565 (*sea* - 120 pb), ATCC 14458 (*seb* - 478 pb), ATCC 19095 (*sec* - 257 pb), FRI 361 (*sed* - 317 pb; *seg* - 287 pb; *sei* - 454 pb e *sej* - 142 pb), *see* (ATCC 27664 - 209 pb) e FRI 137 (*seh* - 213 pb). Poço 1: marcador de peso molecular de 50 pb.

A Tabela 2 apresenta os resultados dos testes da presença dos genes que codificam para as toxinas tipos A, B, C, D, E, G, H, I e J, realizados nas 57 cepas de *S. aureus*, das quais 39 (68,4%) foram positivas para um ou mais genes que codificam para as diversas enterotoxinas pesquisadas e 12 genótipos distintos foram observados.

Por essa tabela verificou-se que, das 38 cepas isoladas a partir do leite cru, 27 (71,1%) possuíam genes para a produção de, pelo menos, um tipo de toxina. A partir do leite pasteurizado e na data de validade, essas porcentagens foram de 62,5% (5 em 8 cepas) e de 63,6% (7 em 11 cepas), respectivamente.

Independentemente de sua origem, a presença de somente um gene responsável pela produção de enterotoxinas foi observada em 25 cepas (64,1%), 9 apresentaram genes para a produção de duas enterotoxinas e 2 (5,1%), para três genes, *sea+sec+seh*. Perfil genotípico para a produção de até quatro enterotoxinas ocorreu em 3 cepas (7,7%), sendo uma *sea+seg+sei+sej*, outra *sea+sed+seg+sei* e a última, *seb+seg+seh+sei*. Genes para as enterotoxinas H, I e J não foram observados isoladamente.

Tabela 2. Perfil genotípico das cepas de *S. aureus*, isolados a partir do leite cru, pasteurizado e na data de validade, em relação às toxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J.

Perfil genotípico	Cru (N= 38)	Pasteurizado (N= 8)	Data de validade (N= 11)
<i>sea</i>	8	2	2
<i>seb</i>	2	-	-
<i>sec</i>	3	1	2
<i>sed</i>	1	-	1
<i>see</i>	2	-	-
<i>seg</i>	1	-	-
<i>seg+sei</i>	4	2	1
<i>sed+sej</i>	2	-	-
<i>sea+sec+seh</i>	2	-	-
<i>sea+seg+sei+sej</i>	1	-	-
<i>sea+sed+seg+sei</i>	-	-	1
<i>seb+seg+seh+sei</i>	1	-	-

Pela Figura 2, observa-se que entre os genes que codificam para enterotoxinas clássicas (SEA a SEE), *sea* foi o mais encontrado, em 16 isolados (41%), seguido por *sec*, em oito (20,5%), *sed* (5/12,8%) e *seb* (3/7,7%) e *see* (2/5,1%). Quanto aos genes das enterotoxinas novas, *seg* foi o mais frequentemente observado, em 11 cepas (28,2%), seguida de *sei*, com somente uma a menos (25,6%) e *seh* e *sej*, com três cada uma (7,7%).

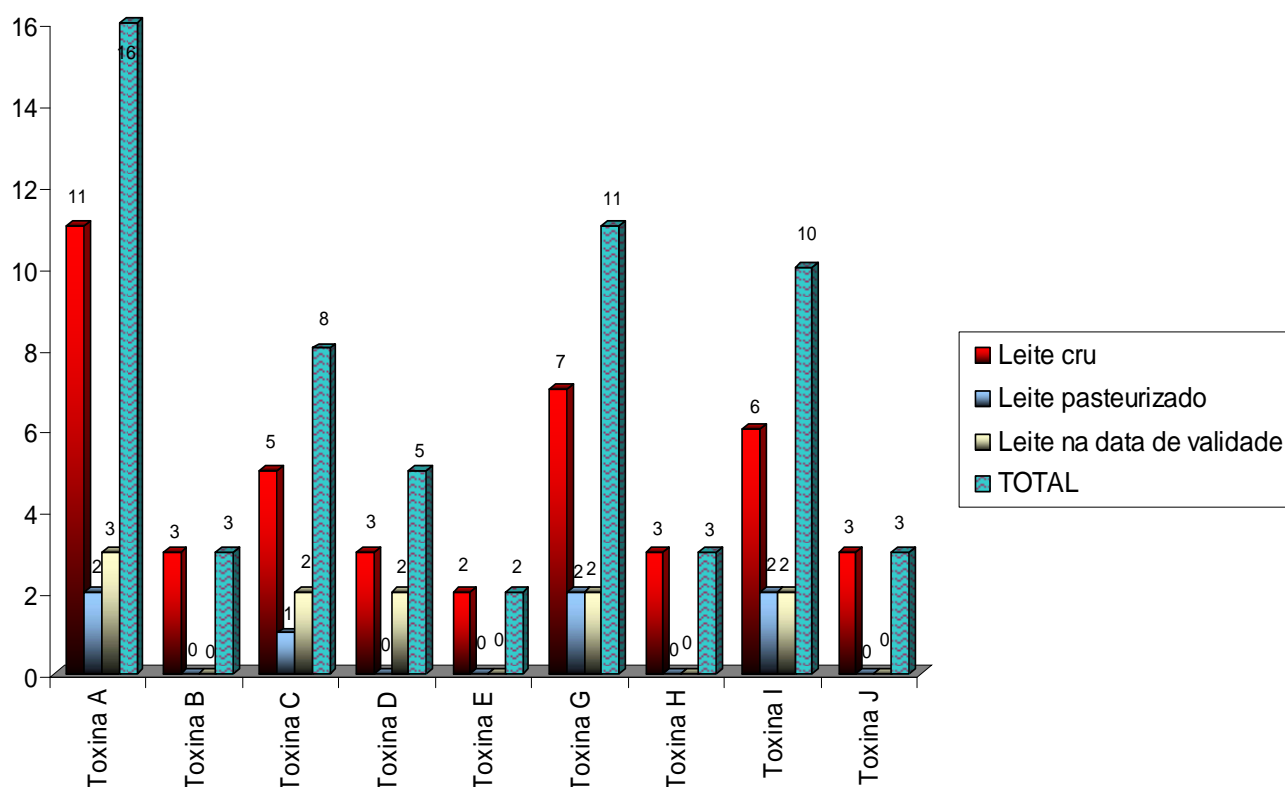


Figura 2. Distribuições dos genes produtores de enterotoxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J, das cepas cepas isoladas do leite cru, pasteurizado e na data de validade.

Quanto aos genes produtores de enterotoxinas, 39 (68,4%) de 57 cepas de *S. aureus* foram positivas para, pelo menos, uma enterotoxina e a *sea A* foi a mais observada, ocorrendo em 16 isolados (41%), seguida de 8 cepas positivas para *sec* (20,5%), 5 (12,8%) para *sed*, 3 para *seb* (7,7%) e 2 (5,1%) para *see*.

Embora a literatura apresente resultados muito variáveis na prevalência de *S. aureus* enterotoxigênicos devido o tipo de alimentos e o biovar envolvidos (MOSSEL; VAN NETTEN, 1990; MATHIEU et al., 1991), é consenso que a toxina A é a mais frequentemente observada entre as cepas de *S. aureus* (JABLONSKI; BOHACHI, 1997; PEACOCK et al., 2002; NORMANNO et al., 2005).

Asao et al. (2003) relataram um surto em Kansai, no Japão, onde 13.420 pessoas foram afetadas pelo consumo de leite desnatado e iogurte (produzido com leite em pó) contaminados com $\leq 0,38$ ng/ml e 3,7 ng/g (leite em pó) de toxina do tipo A, respectivamente. Segundo Balaba e Rasooly (2001), a ingestão de 10 ng já causaria os sintomas da intoxicação.

Scherrer et al., na Suíça, (2004) analisaram 172 amostras de leite de cabra e ovelha e verificaram que 65,2% das 296 cepas eram positivas para a presença de genes responsáveis pela produção de enterotoxinas, valor muito próximo ao observado neste trabalho, de 68,4%. Entretanto, entre as clássicas, o mais encontrado foi *sec* (42%), numa porcentagem muito maior a observada no presente trabalho (20,5%). Katsuda et al (2005), no Japão, observaram que 183 (67,8%) de 270 isolados de *S. aureus* foram positivos para a presença de genes para a produção de uma ou mais enterotoxinas.

Na Itália, em 2007, Morandi et al. também relataram valores muito próximos, de 67%, para o número de cepas de *S. aureus* positivas para a presença de genes para a produção de uma ou mais toxinas, isoladas de leite e derivados. O gene mais frequentemente observado foi *sed* (49,3%), seguido de *sea* (48%), mas pela detecção da produção de toxinas por aglutinação reversa passiva por látex (RPLA), SEA foi a mais observada (41,3%).

Com a descoberta das novas enterotoxinas, aumentou a porcentagem de *S. aureus* enterotoxigênicos ou potencialmente enterotoxigênicos, pois 39 (68,4%) cepas revelaram-se positivas para a presença de, pelo menos, genes para uma enterotoxina. Considerando-se somente as enterotoxinas clássicas (*sea* a *see*), esse número cai para 31 (52,5%). Rosec e Gigaud (2002) também observaram esse aumento do número de cepas enterotoxigênicas com a descoberta das novas SES, pois em seu estudo 30% das cepas genes para as toxinas clássicas e 57% para as novas. Entre as 75 cepas de *S. aureus* positivas para a presença de genes produtores de enterotoxinas pesquisadas por Morandi et al (2007), 19 (25%) eram portadores de genes somente para as enterotoxinas clássicas.

O gene *seg* foi observado em 11 (28,2%) das 39 amostras de *Staphylococcus aureus* produtoras de, pelo menos, uma enterotoxina e em 90,9% das vezes, foi associado à presença de gene *sei*, que ocorreu em 10 isolados (25,6%). Valores semelhantes foram descritos por Rosec e Gigaud (2002), onde *seg* e *sei* estiveram associados em 80,6% das 155 cepas pesquisadas. Esses genes são frequentemente encontrados juntos por estarem presentes em posição sequencial, num fragmento de DNA de 3,2 Kb (JARRAUD et al., 2001). Nashev et al. (2004) também observaram essa associação em 50% das cepas de *S. aureus* pesquisadas. Anteriormente,

Jarraud et al. (1999) haviam relatado essa correlação em 57% das cepas toxigênicas isoladas de portadores e 67%, a partir de cepas isoladas de processos infecciosos. A pequena porcentagem de cepas onde havia presença de apenas uma dessas enterotoxinas poderia ser explicada por uma mutação do sítio de ligação de *seg* ou devido a uma variação do cluster dos genes dessas enterotoxinas (JARRAUD et al., 2001).

Zschock et al. (2005) também observaram a ocorrência simultânea desses dois genes, analisando leite de vacas com mastite e isolando 61 cepas de *S. aureus*, sendo que 36 tinham o gene para *seg* e 22, para *sei*, com 61% dessas cepas, com genes para ambas as toxinas. Lammler et al. (2000) e Omoe et al (2002) já haviam reportado que os genes *seg/sei* são frequentemente encontrados juntos em vacas com mastite e em leite cru.

Nesse trabalho, observou-se perfil genotípico, em três cepas (7,7%), para a produção de até quatro enterotoxinas, sendo uma SEA+SEG+SEI+SEJ, outra SEA+SED+SEG+SEI e a última, SEB+SEG+SEH+SEI. Nashev et al. (2004) também relataram perfis genéticos com presença de múltiplos genes, onde 9,1% das cepas de *S. aureus* apresentaram positividade para quatro toxinas (BGHI) e 4,5%, para cinco (ADGIJ). Omoe et al. (2005) também observaram que a maioria das 69 cepas de *S. aureus* isoladas de surtos de origem alimentar (alimentos ou material clínico dos pacientes) e manipuladores carreavam genes com mais de um tipo de enterotoxina, sendo que a principal combinação foi *sea-seb-seh-sek-seq*, ocorrendo em 21 isolados, seguido de *sea-seh-sek-seq*; *sea-seg-sei-sem-sen-seo*; *sea-sed-sej-ser*, com 5, 4, 2 isolados respectivamente.

Simultaneamente, tivemos a oportunidade desenvolver um projeto, atrelado à uma bolsa de iniciação científica da FAPESP (05/54282-0), onde analisamos 32 amostras de sorvetes e 53 de sobremesas cremosas com ou sem recheio coletadas em padarias, sorveterias, lanchonetes e *bombonieres* da cidade de Botucatu-SP, no total de 85 amostras.

De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2001a), os padrões microbiológicos para sorvetes a base de leite toleram até $5,0 \times 10^2$ UFC/g de estafilococos coagulase positiva. Entre as 32 amostras de sorvetes analisadas, 8 (25%) apresentaram *Staphylococcus* coagulase negativa, onde as espécies

S. schleiferi subsp. schleiferi, *S. haemolyticus* e *S. xylosus* foram as mais freqüentes aparecendo duas vezes cada (6,25%), *S. hominis subsp. hominis* e *S. simulans* apareceram uma vez cada (3,13%), em sabores diferentes do mesmo estabelecimento. *S. aureus* não foi observado em nenhuma amostra de sorvete. Ao contrário desses resultados, Warke et al (2000) isolaram *S. aureus* em 100% das amostras. Na Líbia, El Shaef et al (2006) também encontraram frequentemente *Staphylococcus* coagulase positiva (38%) nos sorvetes analisados e Gündogan et al (2006), em estudo feito na Turquia, isolaram esse micro-organismo em 26,6% (16) das amostras de sorvetes.

Com relação às sobremesas cremosas com ou sem recheio, a RDC N° 12 da ANVISA tolera até 5×10^2 UFC/g de estafilococos coagulase positiva. Em relação as 53 amostras de sobremesas, *S. aureus* foi encontrado em amostras de brigadeiro (25%), de bomba de creme com chocolate (11,2%) e de torta de morango (9,1%). ECN foram isolados de 34 (69,8%) amostras e a espécie *S. warneri* foi mais freqüente, sendo isolada em 15 (28,3%), principalmente nas bombas (9,4%). A seguir, foram mais isolados *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* em 9,4% das amostras, principalmente nas bombas, tortas e mousses. Outras espécies de ECN que foram isoladas com menor frequência estão listadas na Tabela 3.

As 3 amostras positivas para *S. aureus* apresentaram contagens maiores do que as permitidas pela citada legislação, com contaminação de 6×10^3 UFC/g na amostra de brigadeiro, 2×10^3 UFC/g na bomba de creme com chocolate e de 3×10^3 UFC/g na torta de morango.

Tabela 3. Espécies de *Staphylococcus* isoladas a partir de doces e sorvetes.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. cohnii cohnii</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hominishominis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. schleiferi schleiferi</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. xyloso</i>
Sorvetes	-	-	-	2	1	-	-	2	1	-	2
(32) %	-	-	-	6,3%	3,13%	-	-	6,3%	3,13%	-	6,3%
Bomba	1	-	1	2	-	-	-	-	-	5	-
(9)	11,2%	-	11,2%	22,3%	-	-	-	-	-	55,6%	-
Torta	1	-	2	1	-	1	1	1	1	1	2
(11)	9,1%	-	18,2%	9,1%	-	9,1%	9,1%	9,1%	9,1%	9,1%	27,3%
Mousse	-	-	2	-	-	-	-	-	-	1	1
(6)	-	-	33,4%	-	-	-	-	-	-	16,7%	16,7%
Pudim	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-
(8)	-	-	-	-	-	-	-	12,5%	-	12,5%	-
Bolo	-	-	-	1	-	-	-	-	-	3	1
(10)	-	-	-	10%	-	-	-	-	-	30%	10%
Camafeu (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100%	-
Brigadeiro	1	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-
(4)	25%	25%	-	25%	-	-	-	-	-	25%	-
Outros*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100%	-
(3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100%	-

* Pão de coco recheado, sonho e trufa

Os resultados obtidos na pesquisa dos genes produtores das toxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEJ, em *S. aureus* e ECN isolados das amostras de sorvetes e sobremesas, através da metodologia de PCR apresentou três (3,5%) amostras com genes produtores de enterotoxinas, onde cada uma destas foi positiva para um tipo de toxina. As toxinas positivas foram *sea* de *S. warneri*, *sej* de *S. aureus* e *seh* de *S. xylosus*, sendo o restante das cepas, negativas para os outros genes produtores de enterotoxinas. O kit RPLA (Oxoid) contempla somente as enterotoxinas clássicas SEA, SEB, SEC e SED, assim, somente a cepa de *S. warneri*, que apresentava o gene *sea* foi testado quanto a sua produção, sendo negativo. Os resultados concluíram que a incidência de genes produtores de enterotoxinas testadas, em *Staphylococcus* sp foi baixa. Entretanto, deve ser lembrado que a maioria das amostras testadas foi de estafilococos coagulase negativa, espécies que, somente recentemente, tem sido envolvidas em surtos de intoxicações alimentar e cujo papel ainda não estão bem esclarecidos.

Após os resultados, onde evidenciamos a grande contaminação do leite por *S. aureus*, nosso foco se voltou para os queijos, que além de poderem ser produzidos com matéria prima de origem duvidosa, alguns tipos, como o Minas Frescal, sofrem intensa manipulação durante seu processamento. Essa prática, com certeza, leva à contaminação por outro grupo de estafilococos, os coagulase negativa, patógenos oportunistas ao homem, em outras situações, mas que em alimentos sempre foram considerados contaminantes. O início do projeto, com o isolamento e identificação desses estafilococos foi realizado por uma aluna de iniciação científica (FAPESP 2008/54728-7). Nesse trabalho, **Rall et al (2010a)** analisaram 90 amostras de queijo tipo Minas Frescal de diferentes marcas comercializadas em Botucatu, sendo isoladas 65 (72,2%) cepas de ECN, sendo 23 (35,4%) *S. saprophyticus*, 16 (24,6%) *S. warneri*, 10 (15,4%) *S. epidermidis*, 9 (13,8%) *S. xylosus*, 3 (4,6%) *S. haemolyticus*, 2 (3,1%) *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* and each one of (1,5%) *S. capitis* subsp. *urealyticus* and *S. caprae*. A presença simultânea de duas espécies foi observada numa mesma amostra em duas ocasiões: uma apresentou *S. saprophyticus* e *S. warneri* e a outra, *S. warneri* e *S. epidermidis*.

S. warneri foi a única espécie apresentando cepas com os genes *sea*, *seb* e *sec*. Apesar da presença desses genes, essas cepas não apresentaram produção *in vitro*, pelo método de RPLA.

Como já esclarecido *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos mais isolados de alimentos, causando vários surtos (Veras et al., 2008), mas o potencial patogênico dos ECN, como causadores de doenças de origem alimentar ainda não está esclarecido.

Por técnicas moleculares de PCR, pode-se observar que 17 (26,2%) das cepas de ECN apresentaram genes para a produção de enterotoxinas clássicas. Uma porcentagem similar foi observada por **Rall et al. (2010b)**, com 19,4% de positividade para genes em ECN isolados de manipuladores de alimentos. Uma prevalência menor foi observada por Vernozy-Rozand et al. (1996), com 5,3% desses micro-organismos isolados de leite de cabra positivos para esses genes e Rosec et al. (1997), que não observaram esses genes em 264 cepas de ECN. Por outro lado, *sec* e *sed* estiveram presentes em 57,1% dos ECN isolados por Rodriguez et al. (1996). Veras et al. (2008) encontraram 5 em 8 (62,5%) cepas de ECN com esses genes.

O gene *sea* foi o mais frequentemente encontrado (18,5%), enquanto *sed* não foi observado. Os genes *seb* e *sec* foram encontrados em porcentagens similares (3,1% e 4,6%, respectivamente). Rall et al. (2010b) observaram que *sea* também ocorreu mais frequentemente entre os genes das enterotoxinas clássicas (24,1%).

Apesar da presença desses genes em 26,2% das cepas de ECN, nenhuma delas produziu enterotoxinas *in vitro*, pelo método de RPLA. Estes resultados estão de acordo com Harvey e Gilmour (1988, 1990) que mostraram que nenhuma das 353 e 384 cepas de ECN isoladas de leite de cabra e de leite em pó produziram enterotoxinas, respectivamente. Esses resultados podem ter ocorrido devido às pequenas quantidades de enterotoxinas produzidas, não detectáveis pelo método. A produção de enterotoxinas foi realizada usando o método de sacos de celofane, que é considerada a técnica mais eficiente (Robbins et al., 1974) e, de acordo com as recomendações dos fabricantes, a sensibilidade do kit (Oxoid) é de 0,5 ng/ml. Além disso, todas as cepas padrão ATCC de *S. aureus* produziram as enterotoxinas. De acordo com Robbins et al. (1974), os ECN são pauprodutores (fracos produtores) dessas enterotoxinas,

mesmo em condições ótimas de crescimento. Além disso, defeitos na expressão dessas toxinas podem ocorrer devido a pontos de mutação que convertem esses genes produtores de enterotoxinas em genes silenciosos (OKOJI et al., 1993).

Entretanto, vários autores tem mostrado que essa produção pode ser altamente variável. Crass e Berdgoll (1986) observaram que 10% dos ECN isolados de alimentos e animais eram produtores de enterotoxinas. Uma porcentagem 5,3 % foi reportada por Vernozy-Rozand et al. (1996), enquanto Zell et al. (2008) reportaram que 45,7% dos ECN isolados de alimentos produziram as enterotoxinas. Veras et al. (2008) observaram que 62,5% desses micro-organismos isolados de surtos eram produtores de enterotoxinas. Juntos, nossos dados e outros relatados na literatura apontam que os ECN não devem ser ignorados em estudos epidemiológicos de surtos de origem alimentar, uma vez que a presença de genes que codificam para enterotoxinas indica uma habilidade potencial de essas espécies sintetizarem essas proteínas.

No final de 2011, terminamos um projeto financiado pela FAPESP (2008/58860-7), onde alguns resultados já foram submetidos a revistas indexadas e outros estão em fase final de redação. O título desse projeto foi “Perfil genético e fenotípico de *Staphylococcus* sp isolados leite de vacas saudáveis e com mastite subclínica”

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, geralmente causada por infecção bacteriana, causando as maiores perdas econômicas na bovinocultura leiteira, devido à redução na produção de leite e de sua qualidade, aumento do uso de medicamentos e morte dos animais (MELCHIOR et al., 2006). É a causa mais freqüente de terapia antimicrobiana em vacas, sendo difícil de ser erradicada, independente da susceptibilidade *in vitro* dos antibióticos utilizados, dependendo do micro-organismo envolvido (VASUDEVAN et al., 2003, CLUTTERBUCK et al., 2007).

Existem muitos micro-organismos responsáveis pela mastite bovina, mas *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* permanecem como os mais comumente isolados, em casos de mastites clínicas, subclínicas e crônicas (VASUDEVAN et al., 2003; MELCHIOR et al., 2006, CLUTTERBUCK et al., 2007).

A mastite, clínica ou subclínica, causada por *S. aureus* é reconhecida como uma das principais doenças que afetam o gado leiteiro (BRAMLEY, 1992), causando perdas financeiras de, aproximadamente, 2 bilhões de dólares (VASUDEVAN et al., 2003). Em 2001, Motta et al. encontraram 39,7% de positividade para mastite subclínica, a partir de 362 amostras de leite de vaca com mastite, no interior do estado do Rio de Janeiro. Valores semelhantes foram observados De Freitas e Magalhães (1990), no Rio de Janeiro, com 37,7% de positividade. Frequências menores foram observados em Minas Gerais, por Ribeiro et al. (1991), que encontrou 15,6% das amostras positivas e Nader Filho et al. (1988), com 11,9%, em São Paulo.

O papel dos estafilococos coagulase negativa (ECN) recentemente foi revisto e esses micro-organismos, antes considerados contaminantes, agora são causa freqüente mastite, principalmente subclínica (Taponen et al., 2007). Nos Estados Unidos, a ocorrência descrita é de, aproximadamente, 15%. Hoe e Ruegg (2005) encontraram 19,5% e Bradley et al. (2007) e Pol e Ruegg (2007), 15%. Os ECNs compreendem um grupo heterogêneo dentro do gênero *Staphylococcus*, mas *S. epidermidis*, *S. simulans* e *S. chromogenes* são os mais comuns (Luthje e Schwarz, 2006; Taponen et al., 2006).

Um importante fator de patogenicidade em *Staphylococcus* é a produção de enterotoxinas, mas existe uma grande controvérsia sobre o papel das enterotoxinas na mastite. Segundo Sutra e Poutrel (1994), SEC e SED são as mais importantes nos processos infecciosos intramamários, uma vez que induzem a liberação de fatores inflamatórios. Recentemente, Zecconi et al. (2006) identificaram ao menos um gene das enterotoxinas em todos os bovinos estudados na Itália e o gene *sej*, em particular, pareceu ser um fator de risco. Por outro lado, autores como Larsen et al. (2000) argumentaram que os genes dessas enterotoxinas não parecem ter um papel importante no quadro de mastite, uma vez que somente 1 em 414 animais com mastite apresentou *S. aureus* com o gene *sec*, na Dinamarca.

Foram analisadas 279 amostras de leite de vacas saudáveis, com o isolamento de 63 (22,6%) cepas de *Staphylococcus* sp, sendo 19 isolados de *S. saprophyticus* (30,2%), 15 de *S. warnei* (23,8%), 11 de *S. epidermidis* (17,5%), 5 de *S. haemolyticus* (8%), 7 de *S. xylosus* (11,1%), 2 de *S.*

chromogenes (3,2%) e uma (2%) de *S. hominis*, *S. aureus*, *S. cohnii ssp cohnii* e de *S.simulans*.

Entre as 293 amostras de leite de vacas com mastite subclínica, 80 (27,3%) foram positivas para esses micro-organismos, 22 cepas de *S. warnei* (27,5%), 14 de *S. aureus* (17,5%), 13 de *S. saprophyticus* (16,3%), 11 de *S. epidermidis* (13,8%), 7 de *S. haemolyticus* (8,8%), 6 de *S. xylosus* (7,5%), 4 de *S. simulans* (5%), 2 de *S. capitis* (2,5%) e uma de *S. cohnii ssp cohnii* (1,3%).

A presença de *S. aureus* foi estatisticamente significativa ($z = 2,805$; $p = 0,005$) nos animais doentes, enquanto que a dos ECN também o foi, mas nas vacas saudáveis ($z = 2,772$; $p = 0,006$)

Pela PCR, foi pesquisada a presença de vários genes, que codificam para a produção de enterotoxinas. O gene *sea* (*staphylococcal enterotoxin a*), responsável pela produção da enterotoxina A (SEA) foi o mais frequente, estando presente em 27 (42,9%) das 63 cepas de estafilococos isoladas de leite de vaca saudáveis e em 42 (52,5%) do leite das vacas doentes. Se for considerado somente as cepas de *S. aureus* (independente do tipo de leite), essa porcentagem sobe para 57,1%. Boynukara et al. (2008) também observaram esse gene em maior frequência, porém em somente 23,6% das cepas e *S. aureus*, isoladas de mastite subclínica. Wang et al. (2009) obtiveram o mesmo resultado, com valores mais próximos aos obtidos nesse trabalho, de 36%. Resultados com porcentagens maiores e próximas aos encontrados no atual trabalho foram observados por Atanassova et al. (2005), onde o gene *sea* esteve presente em 50% das cepas de *S. aureus*. Em 2005, Omoe et al. encontraram 58% de positividade para o mesmo gene. Aragon et al. (2007) e Morandi et al. (2007), obtiveram 54% e 48%, respectivamente, na análise de *S.aureus*, isolados de diferentes alimentos.

Se somente os ECN forem considerados, as porcentagens de presença do *sea*, isolados a partir do leite de animais sadios e doentes foram, respectivamente, de 41,9% e 27,3%. Rall et al. (2010a) observaram a frequência de 18,5% desse gene em ECN, isolados de queijos tipo Minas Frescal.

O fago de *Staphylococcus* ϕ Sa3 carrega os genes *sea* (ϕ Sa3mu) e o gene *sep* (ϕ Sa3nu). O gene *sep* esteve presente em 17 (27,4%) dos 62 ECNs isolados de vacas sadias e em 28 (35%) das doentes, sendo 3 (21,4%) *S.*

aureus e 25 (37,9%) de ECNs. Em ambos os grupos, foi observada diferença estatisticamente significativa, em relação à presença dos 2 genes ($p= 0,002$, para as sadias e $p < 0,001$, para as doentes).

Em relação ao *seb*, somente dois ECN (3,2%) isolados de leite e vacas saudáveis e 1 (1,5%), de leite de vacas doentes apresentaram tal gene. Esse gene parece estar presente sempre em baixas taxas, na população de *Staphylococcus* sp, pois Boynukara et al. (2008) encontraram 1,9%, Wang et al. (2009), 2,1% e em alguns trabalhos, sequer foi observado (STEPHAN et al., 2001; KUZMA et al, 2003; PINTO et al., 2005; CREMONESI et al., 2005; MORANDI et al., 2007). Entretanto alguns autores, no Brasil, relataram positivities bem maiores, como Silva et al. (2005), com 11% e Nader Filho et al. (2007), com 52,8%. Deve ser ressaltado que todos os dados descritos são de *S. aureus*, pois apesar da vasta literatura sobre a pesquisa de enterotoxinas pela PCR, poucos são os trabalhos com ECN. Rall et al. (2010a) observaram positividade de 3,1% para o gene *seb*, isolados de queijo tipo Minas.

O gene *sec*, que codifica para a enterotoxina SEC, não foi observado nas cepas isoladas a partir do leite de vacas saudáveis, ocorrendo em 10% das cepas isoladas de vacas doentes. Se forem consideradas somente as cepas de *S. aureus*, essa porcentagem foi de 14,3%. Considerando-se somente essa, vários autores observaram resultados semelhantes como Akinedem et al. (2001), com 15,5%, Cremonesi et al. (2005), com 16,1% e Pinto et al. (2005), com 17%. Entretanto, existem trabalhos que relataram desde sua ausência ou porcentagens muito baixas como Boynukara et al. (2008) e Karahan et al. (2009), respectivamente, até resultados muito expressivos, como Stephan et al. (2001), com 88,5% e Silva et al. (2005), com 89%.

Segundo Baba et al. (2002) e Holtfreter e Broker (2005), uma família de ilhas de patogenicidade relacionadas pode carrear *sec- sel- tst* (SaPI2) ou somente *sec-sel* (SaPI3). O gene *sel* não foi observado nas cepas isoladas de animais sadios (assim como *sec*), mas foi encontrado em 6 (7,5%) cepas de animais doentes, sendo 2 (14,3%) *S. aureus* e 4 (6,1%) ECNs, duas cepas a menos, em relação a *sec*, entretanto essa diferença não foi significativa ($p= 0,533$)

Surpreendentemente, *sed* ocorreu em baixas porcentagens, pois é considerado o segundo mais frequente, depois de *sea* (BAYLES e IANDOLO,

1989), sendo isoladas duas cepas (3,2%), a partir de vacas saudáveis e 1 (1,3%), a partir de vacas doentes. Embora Boynukara et al (2008) não observaram esse gene em 106 amostras de *S. aureus* isolados de mastite subclínica. No Brasil, Pinto et al. (2005) também observaram baixa frequência de *sed* (0,8%). Ainda em nosso país, Nader Filho et al. (2005) obtiveram porcentagens bem maiores, de 44,4%. Resultado um pouco menor, mas ainda assim, bem mais significativo do que o encontrado nesse trabalho foi relatado por Akinedem et al. (2001), com 20,3% e Cremonesi et al. (2005), com 30,1%.

Segundo Zhang et al. (1998), *sed* e *sej* estão localizados no plasmídeo de penicilinase pIB485. Em relação às cepas isoladas de leite de animais saudáveis, os mesmos 2 (3,2%) ECNs que apresentaram *sed* também apresentaram *sej*. Mas em relação aos animais doentes, *sej* foi mais frequente que *sed*. Esse último foi observado em somente uma (1,3%) cepa de ECN, como já descrito e *sej* ocorreu em 4 (5%), sendo 2 (14,3%) *S. aureus* e 2 (3%) ECN, diferença não estatística ($p=0,754$).

Quanto ao gene *see*, uma cepa de ECN (1,6%) foi positiva a partir de animais sadios e duas (2,5%), a partir dos doentes, com uma cepa de *S. aureus* (7,1%) e uma de ECN (1,5%). Cremonesi et al. (2005) e Wang et al. (2009) não observaram *see*, a partir de cepas de *S. aureus* isolados de mastite subclínica. No Brasil, Pinto et al. (2005) não narraram a ocorrência desse gene. Vários outros autores também não o observaram em *S. aureus* (MORANDI et al., 2007; CHIANG et al., 2008). Em relação aos ECNs, Park et al. (2011) não observaram esse gene em 263 cepas analisadas.

Os genes *seg* e *sei* serão discutidos juntos, pois ambos fazem parte do cluster *egc*, localizado na ilha de patogenicidade Tipo II vSa β , que pode albergar *seg-sei-selm-seln-selo* e, as vezes, *selu* (WANG et al., 2009). Nas amostras de leite dos animais saudáveis, o gene *seg* foi observado somente em ECN, ocorrendo em 24 (38,7%) das 62 cepas desse grupo. Nos animais doentes, foi observada uma porcentagem um pouco maior, com 33 (41,3%) de cepas positivas para esse gene, sendo 7 (50%) *S. aureus* e 26 (39,4%) ECNs, observando-se resultados muito próximos entre os ECNs de vacas sadias (38,7%) e doentes (39,4%).

Em relação ao gene *sei*, este foi detectado em 22 (35,5%) das 62 cepas de ECN, isoladas e animais saudáveis, ocorrendo em 91,7% das vezes

que *seg* esteve presente. Em relação aos animais doentes, *sei* foi observado em 30 cepas (37,5%), nas mesmas 7 (50%) cepas e *S. aureus* e em 23 (34,8%) dos ECNs, ocorrendo em 88,5% das vezes em que *seg* esteve presente nesse grupo. Apesar da presença sempre um pouco menor de *sei* em relação a *seg*, nos grupos de vacas saudáveis e doentes, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,520$ e $p=0,255$, respectivamente). Jarraud et al. (1999) haviam relatado essa correlação em 57% das cepas enterotoxigênicas isoladas de portadores e 67%, a partir de cepas isoladas de processos infecciosos. Rosec e Gigaud (2002) descreveram uma associação entre esses genes de 80,6%, em 155 cepas positivas e Nashev et al. (2004) observaram essa associação em 50% das cepas de *S. aureus* isoladas das fossas nasais de manipuladores de alimentos.

Apesar de estarem no mesmo *cluster*, essa diferença pode ser explicada por uma mutação do sítio de ligação dos *primers* ou devido a uma variação do *cluster* dos genes dessas enterotoxinas (JARRAUD et al., 2001).

Nashev et al. (2004) estudaram 44 cepas de *S. aureus* e 12 (27,3%) foram positivas para os genes *seg* e *sei*, valor menor ao encontrado nesse trabalho. Zschock et al. (2005) observaram valores semelhantes ao de Nashev et al. (2004), para o gene *sei* (21,2%), mas próximos aos obtidos nesse trabalho para *seg* (34,6%). Wang et al. (2009) também tiveram resultados semelhantes aos nossos, para os genes *seg* (31,4%) e *sei* (31,8%). Valores menores foram relatados por Akinedem et al. (2001) e Karahan et al. (2009), com 20,3% e 2,2% de positividade para ambos os genes, respectivamente. Valores bem maiores foram relatados por Katsuda et al. (2005) que analisaram 270 cepas de *S. aureus*, isoladas de mastite e 65,9% apresentaram ambos os genes.

O gene *seh* foi encontrado em 8 (12,7%) isolados, a partir dos animais saudáveis, estando presente na única cepa de *S. aureus* e em 7 (11,3%) ECNs. Nos animais doentes, esse gene esteve presente em 13 (16,3%) cepas, sendo 3 (21,4%) *S. aureus* e 10 (15,2%) ECNs. Segundo a literatura, assim como a positividade dos outros genes pesquisados, os resultados foram bem variáveis, de ausente, como observado por Zschock et al. (2005), em pequena porcentagem, de 3,2% (WANG et al., 2009) e em valores mais altos, de 20,5% e 28% (OMOE et al., 2005, BANIA et al., 2005, respectivamente)

O gene *sek* não foi observado em nenhuma das amostras. Foi interessante perceber, após análise os dados que o gene *seq* também foi negativo para todas as cepas e ambos os genes podem estar juntos na ilha de patogenicidade SaPI1, onde se encontram esses dois genes mais o *seb*, que ocorreu em números muito baixos também (3,2% entre os ECNs isolados de vacas sadias e 1,5% entre o mesmo grupo, nas vacas doentes) essa diferença não foi significativa ($p=0,584$). Existem poucos trabalhos com a pesquisa dos genes citados. Wang et al. (2009) observaram, a partir de 283 cepas de *S. aureus* isolados de mastite subclínica, as porcentagens de 2,1% para *seb* e 3,2% para *sek*, sendo que *seq* não foi pesquisado. Omoe et al. (2005) encontraram valores muito maiores, mas a origem das cepas estudadas não era de alimentos sim de humana, observando 30,1% para *seb*, 22,9% para *sek* e 21,1% para *seq*.

Os genes *sem*, *sen* e *seo* (Figuras 3, 4 e 5) também pertencem ao cluster *ecg* e assim serão discutidos em conjunto. Nas amostras dos animais sadios, as positivities desses genes foram de 33,3%, 30,2% e 28,6%, respectivamente.

Nos animais doentes, as porcentagens foram de 38,8%, 40% e 33,8%, respectivamente. Esses resultados não variaram entre o mesmo grupo (*sem*, *sen* e *seo* nas cepas de vacas sadias) e nem entre cada gene, comparando-se os dois grupos. Valores menores foram encontrados por Wang et al. (2009), que encontraram 26,9% para *sem* e 17,3% para *sen*, na ausência de *seo*. Em alimentos de outras origens, como porco, Hwang et al. (2007), observaram 37% de positividade para os genes *sem* e *sen* e de 27% para *seo*. Omoe et al. (2005) encontrou valores bem maiores, mas deve ser ressaltado que as cepas eram somente de *S. aureus*, isolados de humanos, com 39,2% para *sem*, 44,6% para *sen* e 35,5% para *seo*.

O gene *ser* ocorreu em 5 (8,1%) das 62 cepas de ECNs, isoladas de vacas sadias e em 7 (8,8%) das doentes, sendo 1 (7,1%) *S. aureus* e 6 (9,1%) ECNs. Chiang et al. (2006) encontraram esse gene em 5,4% das 147 cepas de *S. aureus* analisadas.

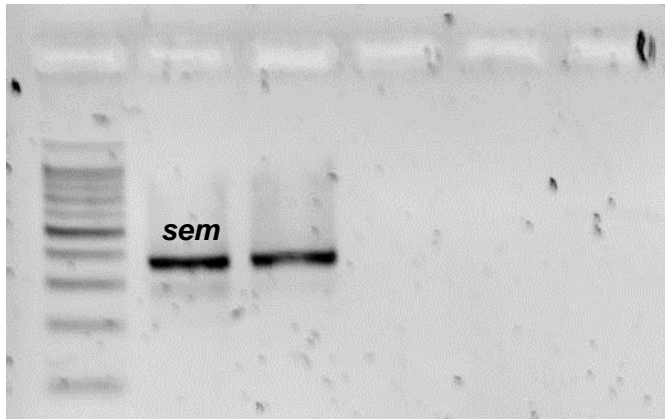


Figura 3. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene da toxina M (*sem* - 379 pb). Poço 1: marcador de peso molecular de 100 pb; 2: *Staphylococcus aureus*. FRI 361; 3: amostra positiva; demais poços: amostras negativas.

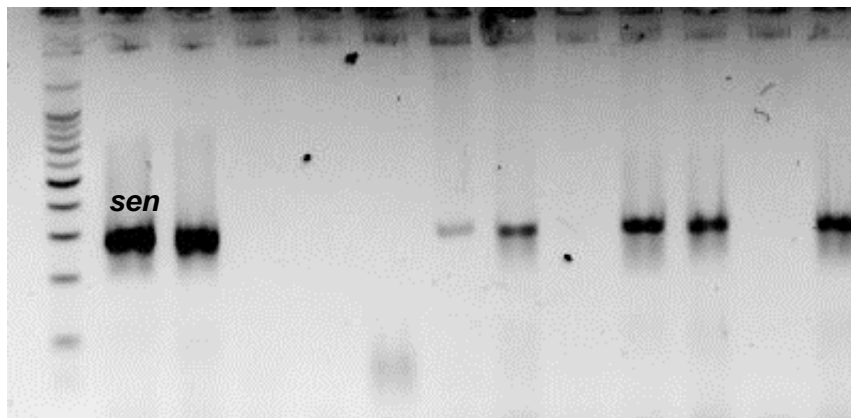


Figura 4. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene da toxina N (*sen* - 282 pb). Poço 1: marcador de peso molecular de 100 pb; 2: *Staphylococcus aureus*. FRI 361; 3, 7, 8, 10, 11: amostras positivas; 4, 5, 6 e 9: amostras negativas.

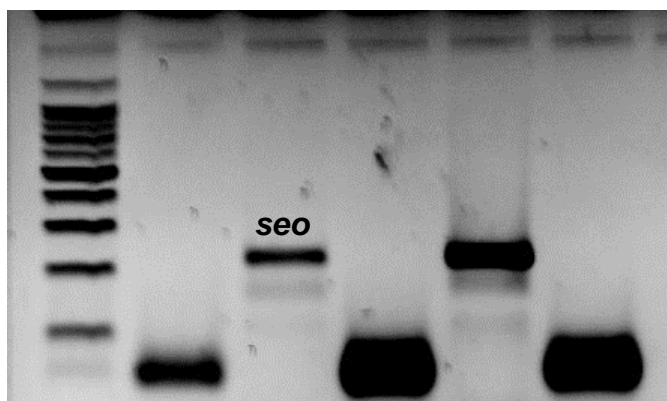


Figura 5. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene da toxina O (*seo* - 214 pb). Poço 1: marcador de peso molecular de 100 pb; 2: controle negativo; 3: *Staphylococcus aureus*. FRI 361; 4, e 6: amostras negativas; 5: amostra positiva.

Cada gene foi submetido ao teste z de comparação de proporções, comparando-se os grupos de animais saudáveis e doentes e somente *sec* apresentou diferença estatística entre esses grupos.

As cepas de *Staphylococcus* sp que apresentaram os genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* foram submetidas ao teste *in vitro*, com um kit, baseado em reações de aglutinação reversa passiva em látex (RPLA). Paralelamente, também foram submetidas ao RT-PCR.

Assim, entre as 15 cepas de *S. aureus* (independente da origem, vacas doentes ou sadias), 9 (60%) apresentaram o gene *sea* e as 9 foram positivas para as reações do RT-PCR e do kit, revelando sensibilidade de 100%. Quanto ao *sec*, das 2 cepas (13,3%) positivas, ambas foram positivas pela técnica molecular, mas somente uma, pelo kit. Todos os outros genes foram testados quanto à sua expressão por RT-PCR (não existem kits comerciais para as outras enterotoxinas), mas nenhum foi positivo.

Entre todos os ECNs somente uma cepa (9,1%) de *S. epidermidis*, entre as 11 dessa espécie, isoladas de vacas doentes, foi positiva pela RT-PCR, mas negativa pelo kit. Todas as cepas restantes foram negativas aos testes moleculares e de RPLA.

Para o controle interno, de todas as cepas, da extração de RNA, o RNA ribossomal 16S foi pesquisado, por *primers* específicos, correspondentes a regiões do gene rRNA conservadas entre os estafilococos.

Deve ser ressaltado que a presença de mRNA não implica, necessariamente, na produção da proteína correspondente (STRACHAN 2002). A quantidade dessa produção depende da estabilidade do mRNA e da taxa de sua tradução (LODISH et al., 2005). Assim, todas as técnicas utilizadas para a quantificação de mRNA proporcionam um nível de informação empírica e não uma condição estável absoluta, existindo limitações intrínsecas dessas técnicas, pois a quantidade de mRNA nem sempre está correlacionada com a quantidade de proteína. A sensibilidade e variações dos métodos existentes são tais que os RNAm que estão em menor quantidade não são facilmente medidos como ocorre com os RNAm que estão presente em quantidades maiores e finalmente, a atividade das proteínas codificadas pelo mRNA pode ser regulada em vários níveis, após sua expressão, isto é, a extensão em que

as proteínas são pós traducionalmente modificadas não são reveladas pela medição da quantidade de RNAm (BINNECK, 2004).

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que os genes que codificam para as enterotoxinas estafilocócicas estão distribuídos de maneira homogênea entre as cepas de *S. aureus* e de estafilococos coagulase negativa, isolados de vacas sadias e doentes. A presença da maioria desses genes, mas não sua expressão, nos dois grupos, de maneira indistinta deve levar à reflexão do seu papel na patogênese da doença.

2.2.2.2. Enterotoxinas de *Staphylococcus* sp. isolados de manipuladores

Os manipuladores são importantes peças na qualidade dos alimentos, podendo ser causadores de intoxicações de origem alimentar, pela introdução de patógenos nos alimentos durante o processamento, distribuição e manipulação (ANGELILLO et al., 2000; BASS et al., 2006). *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxinas é considerado um dos maiores causadores de intoxicação de origem alimentar e pode estar presente como um membro persistente ou temporário na microbiota nasal humana, sem causar nenhum sintoma. A presença dessa bactéria nos alimentos é freqüentemente causada pela manipulação imprópria de alimentos, por pessoas portadoras deste micro-organismo (HATAKKA et al., 2000).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a contaminação dos alimentos por manipuladores chega a atingir até 26% dos surtos (SILVA Jr. et al., 1990). Existe uma relação direta entre as condições higiênicas de manipuladores de alimentos e doenças bacterianas de origem alimentar. Manipuladores doentes ou portadores assintomáticos, que apresentam hábitos de higiene pessoal inadequados são considerados a maior fonte de disseminação bacteriana aos alimentos (CARDOSO et al., 1994).

A importância da transmissão de doenças infecciosas pelas mãos de manipuladores foi demonstrada há 120 anos atrás por Semmelweis, mas foi Price (1938), *apud* Crisley e Foter (1965), quem realmente estudou os tipos de bactérias na pele, classificando-as em "residentes e transitórias". Os micro-organismos presentes nas mãos são transitórios, representados principalmente

por bactérias gram-negativas e são facilmente removidos por uma lavagem adequada com bons detergentes. Os micro-organismos residentes, na maioria, gram-positivos, encontram-se em equilíbrio dinâmico como parasitas ou saprófitas na pele, embora 10 a 20% da microbiota estejam concentradas nas reentrâncias, onde os lipídios e o epitélio dificultam a sua remoção. Em muitas pessoas, os estafilococos fazem parte significativa da microbiota residente e, devido à patogenicidade de algumas cepas e capacidade de produzir enterotoxinas, é de grande interesse a sua eliminação nos procedimentos de lavagem das mãos.

As fossas nasais têm sido relatadas como a fonte mais importante de disseminação, sendo colonizadas nos primeiros dias de vida (RADDI et al., 1988). O número dessas bactérias presente no nariz pode variar consideravelmente de indivíduo para indivíduo. As mãos dos manipuladores de alimentos podem ser vetores na propagação das doenças veiculadas por alimentos devido a pouca higiene pessoal ou contaminação cruzada (FUERST, 1983). A contaminação também pode ocorrer devido a aerossóis (RADDI et al., 1988).

No Brasil, Pereira et al. (1994) investigaram um surto de intoxicação estafilocócica causada por um bolo recheado, onde doze pessoas foram afetadas após aproximadamente 4 horas da ingestão. O *S. aureus* produtor de enterotoxina A foi isolado a partir do alimento, das fossas nasais e de uma ferida em fase de cicatrização da manipuladora. Concluiu-se que o alimento foi acidentalmente contaminado, além de ter sido inadequadamente resfriado antes de ser ingerido.

Al-Bustan et al. (1996) verificaram a presença de *Staphylococcus aureus* na cavidade nasal de 26,6% dos 500 manipuladores de alimentos dos restaurantes estudados e 86,6% dos micro-organismos isolados foram positivos para produção de enterotoxinas, sendo 28% de SEA, 28,5% de SEB, 16,4% de SEC e 3,5% de SED. Matute et al. (1997) verificaram a ocorrência de um surto de intoxicação alimentar provocada por *S. aureus* em 6 cantinas escolares na ilha de Tenerife, Espanha. O cardápio era preparado por uma empresa responsável pela distribuição dos alimentos para 24 escolas da ilha. A cepa de *S. aureus* isolada nas fezes dos pacientes foi a mesma da encontrada nas amostras de comida, bem como no material colhido da nasofaringe de um

dos manipuladores. Nashev et al. (2004) estudaram 44 isolados de *S. aureus*, a partir de esfregaços nasais de pessoas hígdas e com infecções cutâneas e as cepas foram testadas frente a vários fatores de virulência, incluindo as enterotoxinas clássicas, além das G, H, I e J. Do total de cepas isoladas, 12 foram positivas para os genes SEG e SEI, cinco para SEB e SEI, quatro para SEB, SEG, SEH e SEI, dois para SEA, SED, SEG, SEI e SEJ. Isoladamente, foram observadas duas cepas positivas para os genes B e H.

Acco et al. (2003), investigaram a presença de *S. aureus* em 47 manipuladores de uma indústria de alimentos, ocorrendo o isolamento do micro-organismo em 14 (30%). Foram selecionadas três colônias de cada placa e após análises em gel de eletroforese (pulsed-field), foi verificada a presença de 25 perfis de DNA diferentes, significando a presença de cepas diferentes da bactéria, num mesmo manipulador.

Em 2005, iniciamos o projeto “Pesquisa de genes responsáveis pela produção de enterotoxinas a partir de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa isoladas das fossas nasais e mãos de manipuladores de alimentos” (FAPESP 05/55706- 9) que, na verdade, foi o pioneiro na utilização de métodos moleculares, gerando o artigo **Rall et al. (2010b)**.

Neste trabalho, pesquisou-se a presença de estafilococos coagulase negativa ou positiva em 3 cozinhas industriais diferentes entre 82 manipuladores de alimentos, onde foram analisados os esfregaços de fossas nasais e das mãos, com isolamento e identificação de 62 cepas coagulase-negativa (75,6%) e 20 cepas coagulase-positiva (24,4%). O isolamento desses micro-organismos era esperado, uma vez que ECN e ECP fazem parte da microbiota permanente da pele.

Na cozinha hospitalar A, foram analisados 50 manipuladores, dos quais 14 (28%) se recusaram a permitir a coleta a partir das fossas nasais. Assim, foi realizada a coleta em somente 36 indivíduos, sendo encontrado 17 (47,2%) amostras positivas para *Staphylococcus* coagulase-negativa e 06 (16,7%) para *Staphylococcus* coagulase-positiva. Além disso, estafilococos coagulase positiva e ECN foram isolados, simultaneamente, em 2 (5,6%) indivíduos. Foram realizadas 50 análises das mãos, sendo observada a presença de estafilococos coagulase-negativa (ECN) em 32 amostras (64%) e

de ECP em 3 (6%), havendo o isolamento simultâneo de ECP e ECN em 1 (2%) indivíduos. Além desses dados, pela Tabela 4 pode-se observar que em 11 (30,6%) das 36 fossas nasais amostradas, não foi isolada nenhuma espécie de estafilococos. Valor semelhante (28%) foi observado em relação a ausência de estafilococos nas mãos desses manipuladores, entre os 50 amostrados.

Entre as cepas de ECN isoladas de fossas nasais 13 foram identificadas, sendo *S. warneri* a espécie mais comum com 9 (69,2%) cepas, seguida por *S. epidermidis* e *S. capitis*, com 3 (23,1%) e 1 (7,7%) isolados, respectivamente. A partir das mãos, 21 cepas de ECN foram identificadas e novamente *S. warneri* foi a espécie mais encontrada, observando-se 20 (95,2%) cepas, seguido de *S. epidermidis* com apenas 1 (4,8%). Essa elevada taxa de contaminação das mãos por *S. warneri* era esperada devido a alta prevalência de isolamento desse micro-organismo nas fossas nasais.

Na cozinha B (cozinha industrial) foram analisadas as mãos e fossas nasais de 17 manipuladores. A partir dos esfregaços das fossas nasais, foram encontradas 6 (35,3,4%) amostras positivas para *Staphylococcus* coagulase-negativa e 4 (23,5%) para *Staphylococcus* coagulase-positiva. A detecção simultânea de estafilococos coagulase positiva e negativa não ocorreu. Nos esfregaços a partir das mãos, observou-se a presença de ECN em 12 (70,6%) amostras, enquanto os estafilococos coagulase-positiva foram encontrados nas mãos de dois (11,8%) indivíduos. Somente 2 cepas de ECN isoladas das mãos puderam ser identificadas, sendo o *S. warneri*, a única espécie encontrada. Pela Tabela 4, pode-se observar que *Staphylococcus* sp. não foi observado em 3 (17,6%) e 7 (41,2%) amostras de mãos e fossas nasais, respectivamente, entre as 17 analisadas.

Tabela 4. Presença de *Staphylococcus* coagulase negativa ou positiva, isolados a partir de fossas nasais e/ou mãos de manipuladores em 3 cozinhas industriais.

Cozinha	Fossas Nasais				Mãos			
	ECN (N = %)	ECP (N = %)	ECP + ECN (N = %)	Ausência (N = %)	ECN (N = %)	ECP (N = %)	ECP + ECN (N = %)	Ausência (N = %)
Cozinha A								
N = 50 (M)	17 (47,2%)	6 (16,7%)	2 (5,6%)	11 (30,6%)	32 (64%)	3 (6%)	1 (2%)	14 (28%)
N = 36 (FN)								
Cozinha B								
N = 17	6 (35,3%)	4 (23,5%)	0	7 (41,2%)	12 (70,6%)	2 (11,8%)	0	3 (17,6%)
Cozinha C								
N = 15	12 (80%)	1 (6,7%)	1 (6,7%)	1 (6,7%)	14 (93,3%)	0	0	1 (6,7%)

Legenda:

ECN: estafilococos coagulase negativa

ECP: estafilococos coagulase positiva

FN: fossas nasais

M: mãos

Na cozinha C, foram analisados 15 manipuladores. A partir das mãos, foram observadas 14 (93,3%) amostras positivas para *Staphylococcus* coagulase-negativa. ECP não foi detectado em nenhuma das amostras. Quanto aos resultados das análises das fossas nasais, observou-se 1 (6,7%) amostra negativa para *Staphylococcus* sp, 12 (80%) amostras positivas para *Staphylococcus* coagulase-negativa e 1 (6,73%) para *Staphylococcus* coagulase-positiva. Segundo a Tabela 5, um (6,7%) manipulador não apresentou estafilococos nas mãos ou fossas nasais e outro apresentou os dois grupos, simultaneamente.

Entre os estafilococos coagulase-negativa isolados de fossas nasais e mãos, foram identificadas 26 cepas, sendo 12 (46,2%) de fossas nasais e 14 (53,8%) de mãos. A espécie mais comumente encontrada nessas regiões foi o *S. epidermidis*, com 19 (73,1%) isolamentos, seguido do *S. warneri* com 06 (23,1%) e *S. xylosus* com 01 isolamento (3,8%).

Os perfis de isolamento, segundo a espécie e local de coleta, estão apresentados na Tabela 5. Considerando-se os dois sítios analisados, foi possível o isolamento de *S. warneri* em de quatro manipuladores (um deles também com *S. aureus* nas fossas nasais) e *S. aureus* foi isolado das mãos e fossas nasais de dois indivíduos, na cozinha A. Na cozinha B, somente em um manipulador foi possível o isolamento de mesma espécie bacteriana, *S. aureus*, a partir dos dois sítios de amostragem. A maior frequência de isolamento da mesma espécie, a partir das mãos e fossas nasais, ocorreu na cozinha C, com 7 isolamentos simultâneos de *S. epidermidis*, seguido por um de *S. warneri*.

Tabela 5. Perfis de isolamento, segundo o local de coleta e a espécie de *Staphylococcus* identificada, nas três cozinhas estudadas.

Perfil	Cozinha A	Cozinha B	Cozinha C
<i>S. warneri</i> (M) + <i>S. warneri</i> (FN) + <i>S. aureus</i> (FN)	1		1
<i>S. warneri</i> (FN)	3		
<i>S. warneri</i> (M)	14	1	
<i>S. aureus</i> (FN) + <i>S. aureus</i> (M)	2	1	
<i>S. capitis</i> (FN)	1		
<i>S. epidermidis</i> (FN)	2		1
<i>S. epidermidis</i> (M)			3
<i>S. warneri</i> (M) + <i>S. warneri</i> (FN)	3		
<i>S. warneri</i> (FN) + <i>S. aureus</i> (FN)	1		
<i>S. warneri</i> (M) + <i>S. aureus</i> (FN)		1	
<i>S. warneri</i> (M) + <i>S. aureus</i> (M)	1		
<i>S. aureus</i> (M)	1	1	
<i>S. aureus</i> (FN)	4	2	1
<i>S. epidermidis</i> (M) + <i>S. warneri</i> (FN)	1		1
<i>S. epidermidis</i> (FN) + <i>S. warneri</i> (M)	1		2
<i>S. epidermidis</i> (M) + <i>S. epidermidis</i> (FN)			6
<i>S. warneri</i> (M) + <i>S.xylosus</i> (FN)			1

FN: fossas nasais
M: mãos

Independente do local da coleta, a prevalência de ECN e ECP isolados a partir dos manipuladores das três cozinhas foi de 20 (24,4%) para *S. aureus*, 37 (45,1%) para *S. warneri*, 23 (28%) para *S. epidermidis* e 1 (1,2%) para as espécies *S. capitis* e *S. xylosus*, segundo Figura 6.

A literatura apresenta resultados muito variáveis na prevalência de *S. aureus* enterotoxigênicos. Essas variações podem ocorrer devido a ampla variedade de alimentos dos quais foram isolados e a sua variedade ecológica, segundo Mossel e Van Netten (1990). Autores como Mathieu et al. (1991) mostraram que a taxa de *S. aureus* enterotoxigênicos varia de acordo com seu biovar e o biovar mais frequentemente toxigênico são amostras isoladas de humanos.

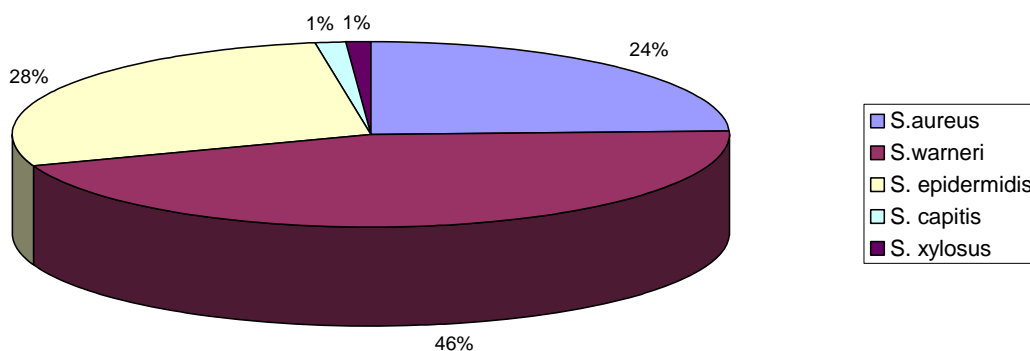


Figura 6. Distribuição das espécies de *Staphylococcus*, isoladas a partir de 82 manipuladores de alimentos, em três cozinhas industriais, na cidade de Botucatu.

Vários autores vem relatando a presença de *S. aureus*, nas fossas nasais de manipuladores. Já em 1964, Lowbury et al. observaram que entre 35-40% dos manipuladores saudáveis albergavam o micro-organismo nas fossas nasais. Soto et al. (1996) e Vanderbergh et al. (1999) relataram que a taxa de isolamento *S. aureus*, a partir das fossas nasais, numa população adulta saudável podia variar de 20 a 55%. Esses dados estão de acordo com o presente trabalho, pois esse micro-organismo foi isolado a partir das narinas de 15 (22,1%) manipuladores de um total de 68. Valores semelhantes também foram relatados por Ayyildiz et al (1990), com 23% e por Al Bustan et al (1996), com 26,6% de positividade para *S. aureus*. Taxas bem maiores já foram

relatadas por De Wit e Kampelmacher (1988) e Taskanal (1993), com taxas de 77,8% e 74,6%, respectivamente.

No Brasil, Raddi et al (1988) observaram índices bem mais altos do que os encontrados nesse estudo, de 44,1%, a partir das fossas nasais de 48 manipuladores. Esses autores também isolaram *S. aureus* a partir das mãos de 34,8% dos indivíduos amostrados, valor bem maior do que os 6,1% apresentado nesse trabalho. Entretanto, Acco et al. (2003) relataram valores mais próximos, de 30% de positividade para esse micro-organismo.

Ayçiçek et al. (2004) observaram ECN em 56,7% das mãos de manipuladores, taxa um pouco mais elevada a encontrada no presente trabalho, de 45,1%. Os mesmos autores enfatizam que a presença desses micro-organismos em altas concentrações, nas mãos de manipuladores, pode ser considerado um risco à saúde pública.

Com a descoberta das novas enterotoxinas, aumentou a porcentagem de *S. aureus* enterotoxigênicos ou potencialmente enterotoxigênicos, pois quase a totalidade (95%) das cepas de ECP isoladas a partir de fossas nasais e mãos de manipuladores de alimentos revelaram-se positivas para a presença de, pelo menos, genes para uma enterotoxina. Considerando-se somente as enterotoxinas clássicas (SEA a SEE), esse número cai para 13 (68,4%). Rosec e Gigaud (2002) também observaram esse aumento do número de cepas enterotoxigênicas com a descobertas das novas Ses, pois em seu estudo 30% das cepas genes para as toxinas clássicas e 57% para as novas. Os valores observados por esses autores e os encontrados nesse estudo foram maiores aos reportados por Polledo et al. (1985) que, pesquisando as enterotoxinas clássicas de *S. aureus*, observaram somente 12% de cepas positivas para essas toxinas. Esses resultados podem ser explicados pela diferença de metodologia de detecção, uma vez que os autores utilizaram um kit de aglutinação reversa passiva em látex (RPLA), que dependia da produção *in vitro* das toxinas pelas bactérias.

A tabela 6 apresenta os resultados dos testes da presença dos genes que codificam para as toxinas tipos A, B, C, D, E, G, H, I e J, realizados nas 62 cepas identificadas de ECN e 20 de ECP.

Tabela 6. Presença de genes que codificam para a produção de enterotoxinas em *Staphylococcus* sp., isolados de fossas nasais e mãos de manipuladores de alimentos.

Genes	ECN		ECP			
	Mãos	Espécie	FN	Espécie	Mãos	FN
sea	2	<i>S. warneri</i>	2	<i>S. warneri</i>	-	-
	1	<i>S.epidermidis</i>	1	<i>S.epidermidis</i>		
seb	1	<i>S.epidermidis</i>	3	<i>S.epidermidis</i>	-	-
	1	<i>S. warneri</i>				
sec	-		-		-	1
sed	-		-		-	-
see	-		1	<i>S. warneri</i>	-	-
seg	-		-		-	-
seh	2	<i>S. warneri</i>	1	<i>S. warneri</i>	1	3
			1	<i>S.epidermidis</i>		
sei	-		-		-	-
sej	2	<i>S. warneri</i>	1	<i>S. warneri</i>	-	-
	1	<i>S.epidermidis</i>	2	<i>S.epidermidis</i>		
sea + sej	-		-		-	1
sec + see	-		1	<i>S. warneri</i>	-	-
			1	<i>S. capitis</i>		
seg + sei	0		0		-	1
seh + sej	2	<i>S. warneri</i>	1	<i>S. warneri</i>	-	1
sea + seg + sei	1	<i>S. warneri</i>	1	<i>S. warneri</i>	1	2
seb + seg + sei	-		-		-	1
sec + seg + sej	-		-		1	1
sea+see+s eg + sei	-		-		1	2
sea+see+ seh+sej	-		-		-	1
sea+seg+ seh+sei	-		-		-	1

Legenda: ECN: estafilococos coagulase negativa; ECP: estafilococos coagulase positiva; FN: fossas nasais

Entre as 20 cepas de *Staphylococcus aureus*, 19 (95%) foram positivas para um ou mais genes que codificam para as diversas enterotoxinas pesquisadas e 11 genótipos distintos foram observados, conforme Tabela 6.

Entre as enterotoxinas clássicas (SEA a SEE), 13 cepas (68,4%) foram produtoras de, pelo menos, um tipo de enterotoxina. SEA foi a mais encontrada, em nove isolados (69,2%), seguida por SEE, em quatro (30%), SEC (3/23%) e SEB (1/7,7%). Polledo et al. (1985) também relataram a toxina A como a mais encontrada, mas numa frequência bem menor, de (44,4%), seguido de valores diferentes para as toxinas B (35%) e E (5,5%). Entretanto, a toxina C ocorreu em 22% dos isolados, prevalência muito semelhante a observada nesse trabalho. A toxina A tem sido descrita como a mais comum por muitos outros autores como Bergdoll (1990), Jablonski e Bohachi (1997), Peacock et al. (2002) e Normanno et al. (2005).

Em 1996, Al Bustan et al. observaram a presença de *S. aureus* produtores de enterotoxinas em 86,6% dos 500 manipuladores analisados, valores bem mais próximos aos obtidos no presente trabalho. As toxinas A e B apresentaram porcentagens semelhantes, de 28% e 28,5%, respectivamente. SEC ocorreu em 16,4% das cepas e SED em somente 17 (3,5%) manipuladores. O presente trabalho não encontrou a toxina D, mas analisou somente 82 indivíduos, se o número amostral fosse maior, essa toxina poderia ter sido detectada. Nashev et al. (2004) observaram baixa positividade para a toxina D, de somente 4,5% entre os manipuladores amostrados.

Com exceção de uma cepa, que apresentou o gene SEC, isoladamente, todas as outras apresentaram simultaneamente, pelo menos, dois tipos de toxinas, ocorrendo 3 cepas que apresentaram perfil genético para a produção de até quatro toxinas (AGHI, AEHJ e AEGI).

Quanto às enterotoxinas mais recentes, o gene SEG foi observado em 13 (27,1%) das 48 amostras de *Staphylococcus* sp. produtoras de, pelo menos, uma enterotoxina e em 84,6% das vezes, foi associado à presença de gene SEI, que ocorreu em 11 isolados (22,9%). Valores semelhantes foram descritos por Rosec e Gigaud (2002), onde SEG e SEI estiveram associados em 80,6% das 155 cepas positivas para alguma das toxinas. Nashev et al. (2004) estudaram 44 cepas de *S. aureus* e 12 (27,3%) foram positivas para os genes SEG e SEI, valor igual ao encontrado nesse trabalho.

Esses genes são frequentemente encontrados juntos por estarem presentes em posição sequencial, num fragmento de DNA de 3,2 Kb (JARRAUD et al., 2001). Nashev et al. (2004) também observaram essa associação e 50% das cepas de *S. aureus* isoladas das fossas nasais de manipuladores de alimentos, que eram positivas para, pelo menos, uma enterotoxina. Anteriormente, Jarraud et al. (1999) haviam relatado essa correlação em 57% das cepas toxigênicas isoladas de portadores e 67%, a partir de cepas isoladas de processos infecciosos.

A pequena porcentagem de cepas onde havia presença de apenas uma dessas enterotoxinas poderia ser explicada por uma mutação do sítio de ligação de SEG ou devido a uma variação do cluster dos genes dessas enterotoxinas (JARRAUD et al., 2001).

Outro ponto em comum observado com o trabalho de Nashev et al. (2004) foi esses autores terem encontrado somente dois tipos de enterotoxinas sendo produzidas isoladamente, com uma cepa produtoras de SEB e outra, de SEH. No presente trabalho, as cepas de *S. aureus* apresentaram 11 genótipos distintos e somente dois deles referem à presença de somente uma enterotoxina, segundo Tabela 6.

Deve ser ressaltado que entre os 20 estafilococos coagulase positiva, 19 eram positivos para a produção de, pelo menos, uma enterotoxina. Entretanto pode estar havendo uma duplicidade de resultados, pois ocorreu o isolamento simultâneo de ECP, a partir de mãos e fossas nasais de 4 manipuladores e cada um desses pares de cepas apresentou o mesmo perfil toxigênico, sendo, provavelmente, a mesma cepa que foi transferida da narina para as mãos.

Entre as 62 cepas identificadas de estafilococos coagulase negativa, 29 (46,8%) foram positivas para a produção de, pelo menos, um tipo toxigênico, gerando 8 genótipos diferentes.

A enterotoxina mais comumente encontrada foi a SEJ, sendo observada em 9 (31%) cepas, sendo seis de *S. warneri* (66,7%) e três (33,3%), de *S. epidermidis*.

Das 37 cepas de *S. warneri* isoladas, 18 (48,6%) revelaram –se positivas para a produção de, pelo menos, um tipo de enterotoxina. As toxinas tipos SEA, SEH e SEJ foram as mais frequentes, tendo sido detectadas em

seis cepas (33,3%). Como ocorreu com os ECP, entre os 18 isolados, 5 podem estar em duplicada, devido ao isolamento simultaneo, a partir das mãos e fossas nasais do mesmo manipulador e com o mesmo perfil toxigênico.

Entre os 23 isolados de *S. epidermidis*, 10 (43%) também apresentaram positividade para enterotoxinas, sendo o tipo SEB, o mais frequente, encontrado em 4 (40%) cepas. Dentre esses 10 isolados, 3 podem estar em duplicada, como já comentado.

Foi isolada, ainda, uma cepa de *S.xylosus*, que não apresentou gene para nenhuma das enterotoxinas pesquisadas e uma de *S. capitis*, que foi positiva para as toxinas SEC e SEE.

Considerando-se o gene de todas as enterotoxinas, independente da espécie de *Staphylococcus*, o tipo mais comum foi a do tipo A, sendo observada em 17 cepas (35,4%) desse gênero, seguida por SEH e SEJ, ambas com 14 isolados (29,2%), SEG, sendo produzida por 13 cepas (27,1%), SEI, por 11 (22,9%) e SEE, SEB e SEC, por 7 (14,6%), 6 (12,5%) e 5 (10,4%), respectivamente. A SED não foi observada em nenhuma das 48 cepas de *Staphylococcus* sp testadas, segundo Figura 7.

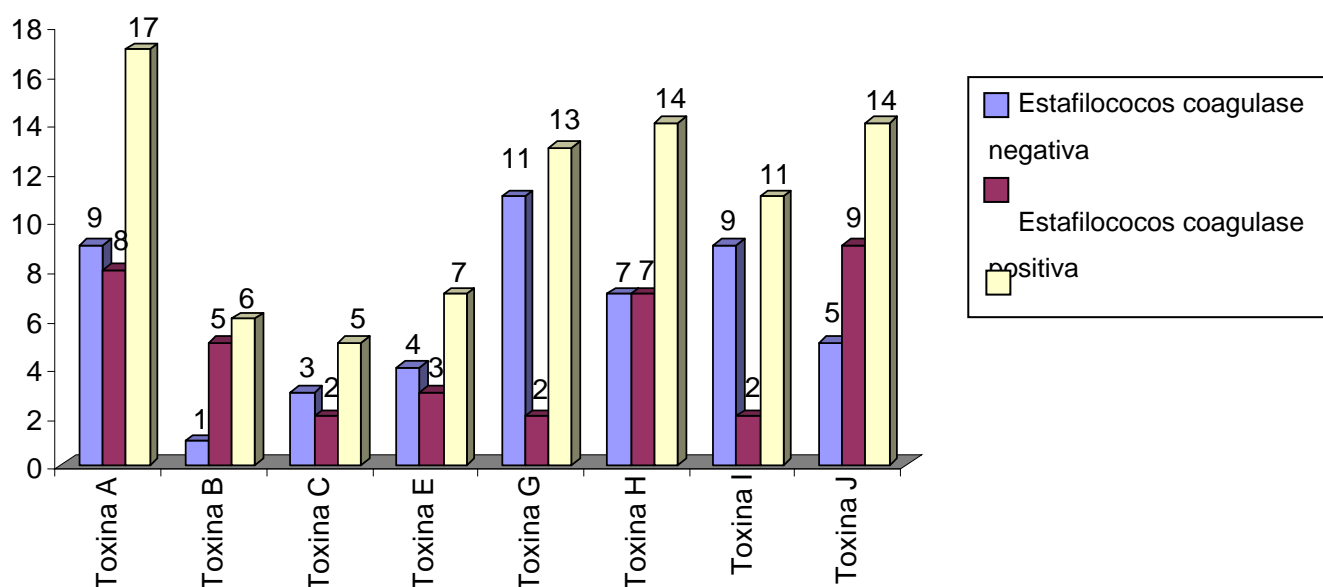


Figura 7. Distribuição dos genes das enterotoxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J entre os estafilococos coagulase negativa e positiva.

Nesse trabalho, três cepas de *S. aureus* apresentaram genes produtores de 4 tipos de toxinas concomitantemente (SEA-SEE-SEG+SEI, SEA-SEE-SEH-SEJ e SEA-SEG-SEH-SEI). Nashev et al. (2004) também relataram perfis genéticos com presença de múltiplos genes, onde 9,1% das cepas desse micro-organismo apresentaram positividade para quatro toxinas (BGHI) e 4,5%, para cinco (ADGIJ). Omoe et al. (2005) também observaram que a maioria das 69 cepas de *S. aureus* isoladas de surtos de origem alimentar (alimentos ou material clínico dos pacientes) e manipuladores carregavam mais de um tipo de enterotoxina, sendo que a principal combinação foi SEA-SEB-SEH-SEK-SEQ, ocorrendo em 21 isolados, seguido de seguidos SEA-SEH-SEK-SEQ; SEA-SEG-SEI-SEM-SEN-SEO; SEA-SED-SEJ-SER; com 5, 4, 2 isolados respectivamente.

Entre as 62 cepas de ECN identificadas, 29 (46,8%) foram positivas para a produção de, pelo menos, uma enterotoxina. A SEJ foi a toxina mais comumente encontrada (31%), seguida da SEA e SEH (24,1%), SEB (17,2%), SEE (13,8%), SEC (6,9%) e SEG e SEI, com 3,4% cada.

Diversos estudos vem comprovando a presença de diferentes espécies de estafilococos coagulase-negativa produtores de toxinas.

O número de cepas de ECN produtoras de enterotoxinas obtidas nesse trabalho pode ser considerado alto, de 46,8% (29 cepas positivas). Prevalência bem menor foi observada por Danielsson e Hellberg (1977) que reportaram 16,2% de 111 cepas de ECN produtoras de enterotoxinas. Entretanto, se for levado em conta somente as enterotoxinas clássicas, tal como o pesquisado no trabalho de Danielsson e Hellberg (1977), esse número cai para 19,4% (12 cepas positivas para SEA a SEE), valor próximo ao observado pelos referidos autores. Crass e Bergdoll (1986) analisaram 2000 cepas de estafilococos das quais 200 eram ECN e 33 delas (16,5%) eram positivas para as enterotoxinas clássicas.

Vernoy-Rozand et al. (1996) observaram a produção da enterotoxina E em cepas de *S. capitis*, *S. xylosus*, entre outros ECN. No presente trabalho, esse tipo de enterotoxina foi observada em cepas de *S. warneri* e *S. capitis*. A única cepa de *S. xylosus* identificada não apresentou genes para a produção de nenhuma das toxinas pesquisadas.

Na Espanha, Pinto et al. (2005) reportaram que 40 das 131 cepas de ECP (60%) e de ECN (40%) eram produtoras de enterotoxinas, sendo os tipos A e C os mais encontrados e SED foi observado em somente uma amostra. Os resultados obtidos na identificação dos *Staphylococcus* e sua capacidade para produção de toxinas, não tem apenas importância epidemiológica, mas também contribui na correlação das espécies com o potencial patogênico

Assim, pudemos concluir que a pesquisa das novas SES aumentou consideravelmente a porcentagem de cepas enterotoxigênicas dos dois grupos, aumentando o potencial patogênico desse grupo de bactérias. Os ECN sempre foram considerados contaminantes de alimentos, sem despertar a atenção. Entretanto, pela descoberta da capacidade de produção de enterotoxinas, o papel desses micro-organismos deve ser revisto e sua importância, reconhecida.

2.2.3. Produção de biofilme por *Staphylococcus* sp.

A formação de biofilmes por *Staphylococcus* constitui um importante fator de virulência no quadro de mastite e em plantas de processamento de alimentos, envolvendo a adesão da bactéria em superfícies sólidas, através de polissacarídeos capsulares, seguida de multiplicação bacteriana, com o desenvolvimento de multicamadas de bactérias envolvidas por uma matriz, composta de uma adesina intercelular polissacarídica (PIA). Na mastite, essas estruturas dificultam a ação de células fagocitárias da resposta imune e de antimicrobianos, devido à baixa difusão através da matriz (FOX et al., 2005; HARRAGHY et al., 2006; CLUTTERBUCK et al., 2007). Tais características permitem a colonização do epitélio da glândula mamária e o estabelecimento de uma infecção persistente (FOX et al., 2005; MELCHIOR et al., 2006).

A capacidade dos *Staphylococcus* produzir biofilme pode ser observada pela triagem das cepas possuidoras dos vários genes responsáveis pela formação desse composto, seguido de testes *in vitro* (CUCARELLA et al., 2004).

A produção da adesina intercelular polissacarídica (PIA) é mediada pelo *locus ica* (intercellular adhesion) (McKENNEY, et al., 1998; CRAMTON et al., 1999), constituídos pelos genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC* e os que parecem

ter maior importância na produção de biofilmes são o *icaA* e *icaD* (ARCIOLA et al., 2001). O gene *icaA* é responsável pela produção da enzima N-acetilglicosaminiltransferase, envolvida na síntese de N-acetilglicosamina (ARCIOLA et al., 2001). O gene *icaD* influi na expressão dessa enzima, responsável pela expressão fenotípica do polissacarídeo capsular (GERKE et al., 1998).

Outros genes importantes, que também regulam a formação de biofilmes são o *bap* (biofilm-associated protein), *agr* (accessory gene regulator) e *sar* (staphylococcal accessory regulator) (ARCIOLA et al., 2001; VANDESUVAN et al., 2003; FOX et al., 2005; MELCHIOR et al., 2006).

O gene *bap*, localizado em uma ilha de patogenicidade móvel, sintetiza a proteína de superfície Bap, que apresenta 2.276 aminoácidos e promove a ligação primária a superfícies abióticas e a adesão intercelular, ao contrário da adesina intercelular polissacarídica (PIA), que parece estar envolvida somente na adesão intercelular (UBEDA et al., 2003; CUCARELLA et al., 2004; LASA; PENADÉS, 2006). Segundo Cucarella et al. (2004), cepas de *S. aureus* *bap* positivas, com inativação ou ausência do operon *ica* continuaram a apresentar síntese de biofilme *in vitro* sem alterações, sugerindo que somente o gene *bap* pode suprir a deficiência da produção de PIA. Tormo et al. (2005) observaram que cepas de *Staphylococcus* que apresentaram o gene *bap* eram fortemente produtoras de biofilme mesmo não apresentando os genes *icaABCD*.

Cucarella et al. (2001) observaram que cepas de *S. aureus* *bap* positiva não foram isoladas de humanos, somente de casos de mastite clínica e subclínica. Entretanto esse gene não está restrito à espécie *S. aureus*, pois genes ortólogos foram encontrados em ECNs como *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans* e *S. hycus* (Tormo et al., 2005). É interessante notar que, inicialmente, a presença de Bap reduz a infectividade, bloqueando a adesão dos componentes do sistema MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules) às células do hospedeiro. Em contraste, essa proteína exerce um efeito oposto nos passos posteriores da adesão, permitindo uma maior persistência da adesão, provavelmente, pela produção do biofilme (Cucarella et al., 2001; Ubeda et al., 2003).

O *quorum-sensing* é um sistema de comunicação entre células bacterianas, que afeta a expressão de vários fatores de virulência. Um dos sistemas desse tipo em *S. aureus* é codificado pelo *locus agr*, que consiste de 4 genes (*agrA*, *agrC*, *agrD*, *agrB*), sendo este *locus* ativado durante a transição da fase de multiplicação exponencial para a estacionária. (VUONG et al., 2000; JEFFERSON et al., 2004). Quando ativado, esse sistema parece inibir a formação de biofilme, nas células de *S. aureus* (VUONG et al., 2000; UBEDA et al., 2003).

O sistema *sar* é composto por um único gene (*sarA*), transcrito pelos promotores P1, P2 e P3, resultando nos mRNAs *sarA*, *sarB* e *sarC*. A proteína SarA age inibindo ou aumentando a transcrição de vários genes. Beenken et al. (2003) observaram que cepas de *S. aureus* com mutação no *locus sarA* apresentaram menor capacidade em formar biofilme, ao contrário do que acontece com o *locus agr*, cuja perda parece aumentar a capacidade de formação de biofilmes (VUONG et al. 2000).

A descrição da produção de biofilmes por cepas de *S. aureus* causadores de mastites clínicas ou subclínicas é bem variável. Em 1993, Baselga et al. encontraram uma baixa porcentagem de cepas produtoras, de 12%. Entretanto trabalhos mais recentes como de Arciola et al (2001) relataram positividade maiores, de 60,8%, semelhantes à encontrada por Vasudevan et al. (2003), de 68,5%. Fox et al. (2005) encontraram 41%, enquanto Oliveira et al (2006) e Vautor et al. (2007) observaram 37,5% e 39%, respectivamente.

Em relação à *S. epidermidis*, Arciola et al. (2001) observaram positividade de 48,5% e Oliveira et al. (2006) observaram, para essa espécie, a mesma porcentagem de cepas produtoras de biofilmes encontradas em *S. aureus*, de 37,5%.

A formação do biofilme pode ser verificada por diferentes métodos. A técnica de microplaca é quantitativa, por leitura em espectrofotômetro (VASUDEVAN et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007). Existem alguns métodos qualitativos, como a utilização de ágar vermelho Congo (CHRISTENSEN et al., 1982; BASELGA et al., 1993), para identificar estafilococos produtores e baseia-se no cultivo de estafilococos sobre o ágar sólido, suplementado com o corante vermelho Congo. Outra metodologia qualitativa é a verificação da produção de biofilme em tubo de borossilicato, corado com azul de tripan (CHRISTENSEN et

al., 1982). Ainda, pode-se avaliar a habilidade dos micro-organismos em produzir biofilme sobre superfície abiótica, por meio do microscópio eletrônico de varredura (PIZZOLITTO, 1997). Embora cada método apresente vantagens e desvantagens, o da microplaca foi descrito como sendo de alta especificidade e sensibilidade (MATHUR et al., 2006).

O projeto FAPESP (2008/58860-7), terminado no final de 2011 também contemplava a pesquisa de alguns genes responsáveis pela produção de biofilme e a verificação da produção *in vitro*, através de duas metodologias.

Nesse trabalho, foram analisadas 279 amostras de leite de vacas saudáveis e com mastite subclínica, com o isolamento de 63 (44,1%) e 80 (55,9%) cepas de *Staphylococcus* sp, respectivamente.

A identificação das espécies já foi descrita na página 29, item das enterotoxinas estafilocócicas, mas optei por repeti-las a fim de evitar possíveis confusões.

Entre as 63 cepas isoladas a partir do leite de vacas saudáveis, 19 eram *S. saprophyticus* (30,2%), 15 *S. warnei* (23,8%), 11 *S. epidermidis* (17,5%), 5 *S. haemolyticus* (8%), 7 *S. xylosus* (11,1%), 2 *S. chromogenes* (3,2%) e uma cepa (2%) de *S. hominis*, *S. aureus*, *S. cohnii ssp cohnii* e de *S. simulans*.

Entre as 80 cepas de leite de vacas com mastite subclínica, 22 cepas foram classificadas como *S. warnei* (27,5%), 14 *S. aureus* (17,5%), 13 *S. saprophyticus* (16,3%), 11 *S. epidermidis* (13,8%), 7 *S. haemolyticus* (8,8%), 6 *S. xylosus* (7,5%), 4 *S. simulans* (5%), 2 *S. capitis* (2,5%) e uma *S. cohnii ssp cohnii* (1,3%).

Pela Figura 8, pode-se observar a aparência de duas cepas produtoras de biofilme (colônia preta) e de duas não produtoras (colônia vermelha).

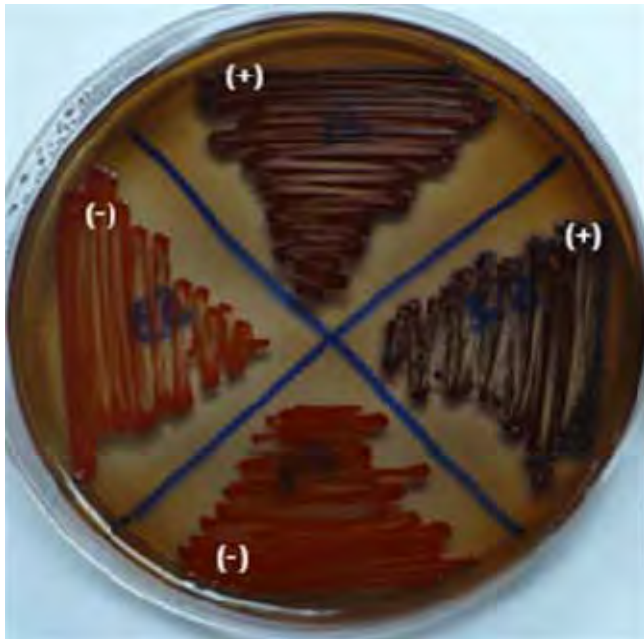


Figura 8. Colônias pretas, positivas (+) para a produção de biofilme e vermelhas, negativas (-), para a não produção.

A produção de biofilme em microplaca pode ser visualizada pela Figura 9. A maior ou menor coloração dos poços indica a quantidade de biofilme formada e corada pelo violeta genciana, cuja leitura foi realizada em leitor de Elisa.

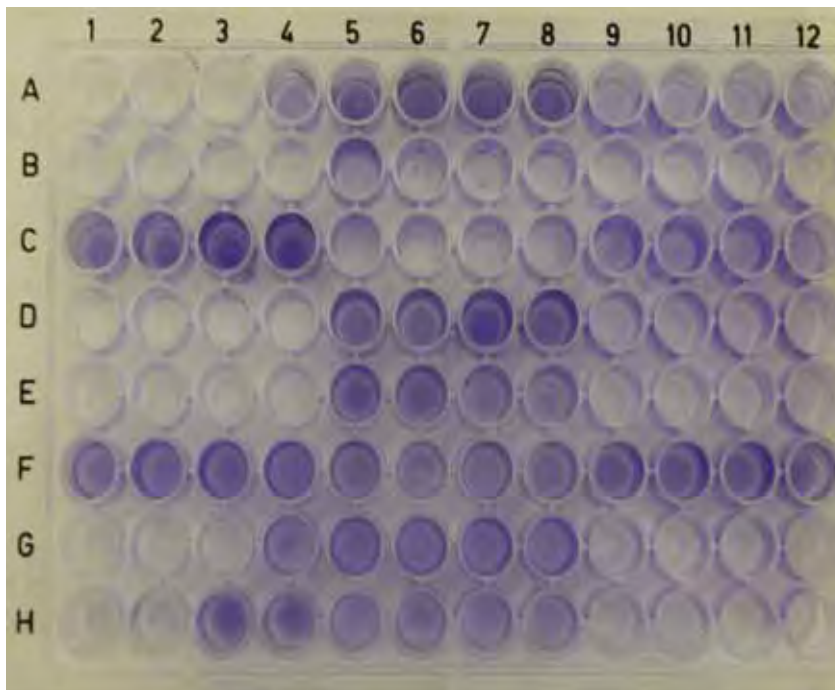


Figura 9. Produção de biofilme em microplaca

A Tabela 7 apresenta o comportamento das 143 cepas isoladas de amostras de leite de vacas saudáveis e com mastite, quanto à presença dos genes *bap* e *icaA* (produção de biofilme) e a expressão da produção de biofilme pelos métodos do ágar vermelho Congo e pela microplaca. Comparando-se os dois métodos, ocorreu diferença estatística entre ambos, sendo a microplaca (0,47) melhor do que o vermelho congo (0,29) com p-valor igual a 0,001.

Tabela 7. Presença dos genes *bap* e *icaA* e dos testes de produção de biofilme *in vitro* (ágar vermelho Congo e microplaca), pelas cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de leite de vacas saudáveis e com mastite clínica ou subclínica.

Espécies	Presença <i>bap</i> N (%)	Presença <i>icaA</i> N (%)	Ágar VC N (%)	Microplaca N (%)	Micro. + VC
<i>S. warnei</i> (37)	-	26 (70,3)	5 (13,5)	15 (40,5)	17 (45,9)
<i>S. aureus</i> (15)	1 (6,7)	11 (73,3)	11 (73,3)	8 (53,3)	12 (80)
<i>S. saprophyticus</i> (32)	-	22 (68,8)	3 (9,4)	13 (40,6)	14 (43,8)
<i>S. epidermidis</i> (22)	-	18 (81,8)	7 (31,8)	8 (36,4)	10 (45,5)
<i>S. haemolyticus</i> (12)	-	8 (66,7)	1 (8,3)	3 (25)	7 (58,3)
<i>S. xylosus</i> (13)	-	5 (38,5)	3 (23,1)	5 (38,5)	9 (69,2)
<i>S. simulans</i> (5)	-	4 (80)	-	2 (40)	2 (40)
<i>S. capitis</i> (2)	-	2 (100)	-	1 (50)	1 (50)
<i>S. chromogenes</i> (2)	-	1 (50)	-	2	2 (100)
<i>S. hominis</i> (1)	-	-	-	1	1 (100)
<i>S. cohnii cohnii</i> (2)	-	1 (50)	-	-	-
Total (N 143)	1 (0,7)	98 (68,5)	30 (21)	55 (38,5)	75 (52,4)

-: negativo; VC: Vermelho Congo; Micro: microplaca

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com Mathur et. (2006), pois o método da microplaca apresentou diferenças estatisticamente significativas, com 55 cepas positivas (38,5%), em relação ao vermelho congo, com positividade de 30 cepas (21%). Entretanto, assim como outros autores, várias cepas eram positivas em um método e negativas no outro e vice-versa. Vasudevan et al. (2003) testaram 35 cepas de *S. aureus* isoladas de vacas com mastite e 32 (91,4%) produziram colônias pretas no VC, enquanto somente 24 (68,6%) foram produtoras pela técnica da na microplaca. Oliveira et al. (2006) observaram que, de 8 cepas *S. aureus* isolados de vacas com mastite subclínica, somente 2 (25%) foram positivos para os dois métodos, enquanto que, entre as 6 cepas de *S. epidermidis*, 4 (66,6%) foram positivas em ambos os métodos.

Em 100% das cepas de *S. chromogenes* (2) e *S. hominis* (1) ocorreu a formação de biofilme, entretanto esses dados não podem ser considerados relevantes frente ao pequeno número de cepas isoladas. Assim, estes não serão considerados nessa discussão.

S. aureus foi a espécie que mais produziu biofilme, que ocorreu em 80% das cepas, independentemente do método de detecção. Fox et al. (2005) encontraram positividade de produção menor para esse micro-organismo, de 41%, mas deve ser lembrado que os autores utilizaram somente uma metodologia, a da microplaca, assim como Vautor et al. (2007), que observaram valores menores ainda, de 26%. Valores maiores foram observados por Melo (2008), onde em 85% das cepas de *S. aureus* produziram biofilme pelo método vermelho-congo. No teste em microplaca, 98,9% dos isolados foram produtores de biofilme e 95,7% apresentavam os genes *icaA* e *icaD*. Ciftci et al. (2009) analisaram 59 cepas de *S. aureus* e 22 (37,2%) foram produtoras de biofilme pelo método vermelho-congo. No entanto, somente 15 (25,4%) foram positivas para os genes *icaA* e *icaD*. Nesse caso, ocorreu a presença de dois genes responsáveis pela produção de biofilme em menor porcentagem do que a produção *in vitro*, deduzindo-se que a esses genes estão envolvidos, mas não são os únicos responsáveis por essa produção. No presente trabalho, o gene *icaA* (Figura 10) ocorreu em 98 (68,5%) cepas, porcentagem maior do que a produção de biofilme, independente do método (52,4%). Com isso, pudemos

inferir que o gene em questão não estava sendo expresso, nas condições dos testes.

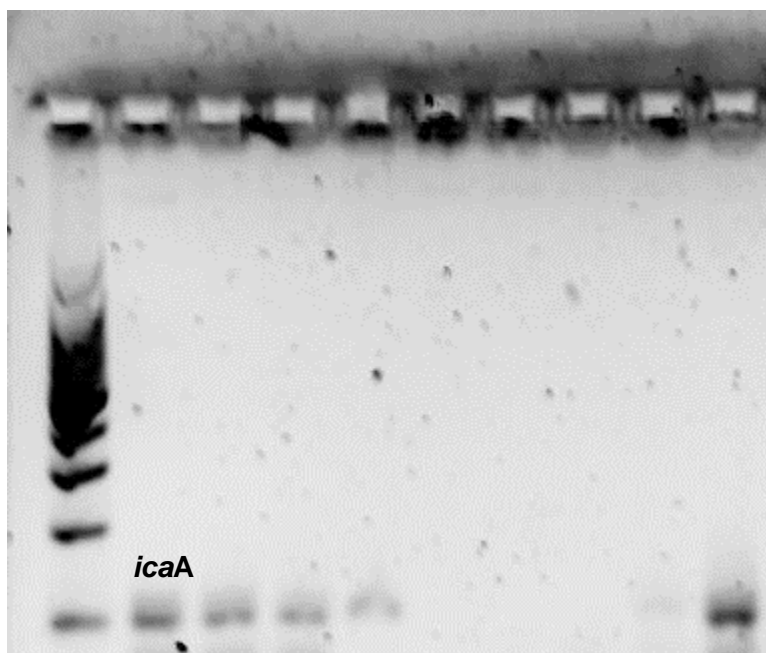


Figura 10. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *icaA* (103 pb). Poço 1: marcador de peso molecular de 100 pb; 2: *S. aureus* (ATCC 35556), 3, 4, 5, 10: amostras positivas; 6, 7, 8 e 9: amostras negativas.

Em relação ao *bap*, somente 1 (6,7%) das cepas de *S. aureus* apresentou esse gene (Figura 11). As várias bandas positivas da foto são cepas *bap* positivas de outro projeto

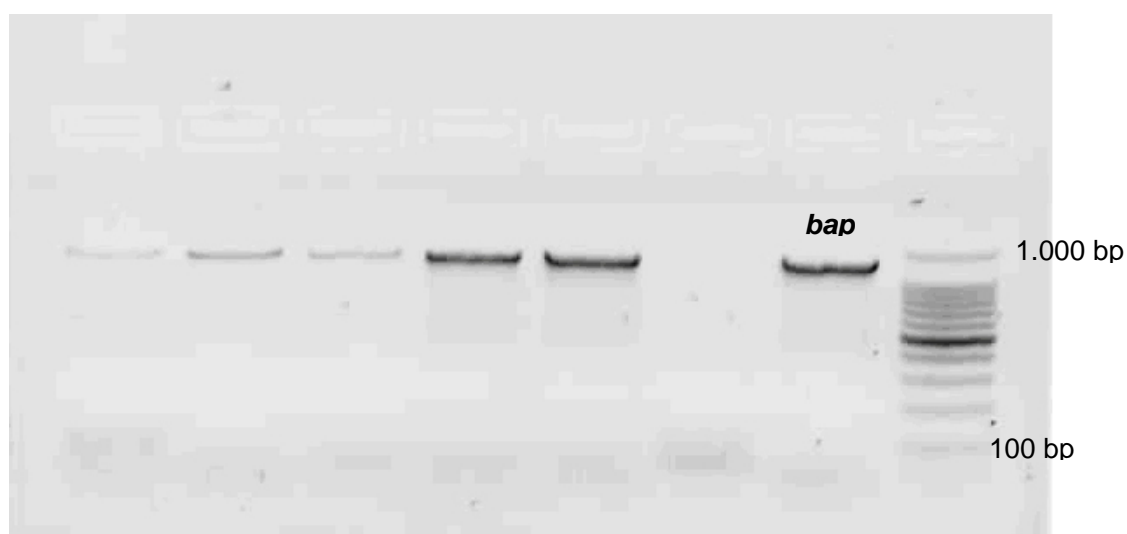


Figura 11. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *bap* (971 pb). Poços 1, 2, 3, 4, 5: amostras positivas; 6: controle negativo; 7: *S. aureus* controle positivo; 8: marcador de peso molecular de 100 pb.

Cuccarella et al (2001) observaram porcentagem semelhante, de 5%. Entretanto, um ano depois Cucarella et al. (2002) observaram a presença do gene *bap* em 25,6% das cepas testadas. Deve ser ressaltado que nesse último trabalho, o número de cepas testadas foi bem maior, de 184, em contraste com as 15 do presente trabalho.

Poucos estudos foram realizados com ECNs (OLIVEIRA, et al., 2006; TAPONEN, 2007). No presente trabalho, 63 (44,1%) das cepas de ECN foram produtoras de biofilme por qualquer um dos métodos analisados.

Especificamente em relação à *S. epidermidis*, Arciola et al. (2001) observaram positividade de 48,5% e Oliveira et al. (2006), de 37,5%. Nossos resultados também apresentaram resultados semelhantes, de 45,5%.

Com a exceção de *S. aureus*, que ocorreu predominantemente em vacas doentes, várias espécies de ECNs foram encontradas de maneira indistinta em ambos os grupos de animais, sugerindo maiores pesquisas que evidenciem o real potencial patogênico desse grupo. Na produção de biofilme, o método da microplaca foi o mais eficiente. Essa produção ocorreu em ambos os grupos, demonstrando ser o biofilme um dos fatores de virulência envolvidos, mas não o único, na patogênese da doença.

II. MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

2.3. *Salmonella* sp

Bactérias do gênero *Salmonella* estão entre as principais causas de enfermidades transmitidas por alimentos (ETA), sendo que os de origem animal são os maiores responsáveis pela veiculação desse micro-organismo, principalmente frangos que são portadores assintomáticos de alguns sorotipos patogênicos para o homem. Em alguns casos, provoca distúrbios intestinais leves ou sintomas mais graves como disenterias. Muitas salmonelas do grupo das infecções paratíficas têm sido isoladas de aves, podendo causar doenças nos seres humanos, mas permanecendo nos animais, tornando-os portadores (Gast, 2003).

2.3.1. Características Gerais

Salmonella é um gênero da família Enterobacteriaceae e se apresentam como bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, geralmente móveis por flagelos peritríqueos, exceto os sorotipos *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, que são imóveis (TIETJEN; FUNG, 1995; ICMSF, 1996). Essas bactérias estão amplamente dispersas na natureza e podem ser encontradas na água, frutas, grãos, flores, árvores e no trato gastrointestinal de vários animais, como insetos, homem e outros mamíferos, além de répteis, aves e insetos (CDC, 2002).

A taxonomia desse micro-organismo é confusa. Pelo Manual Bergey (1986), o gênero é dividido em 5 subgêneros, baseando-se em testes de hibridização DNA/DNA, características bioquímicas e fonte de isolamento. O subgênero I contém a típica *Salmonella* patogênica, isolada a partir do intestino de animais de sangue quente. Os subgêneros II e III são freqüentemente isolados a partir de animais de sangue frio e os subgêneros IV e V são encontrados principalmente no ambiente e raramente identificados como patogênicos para o homem (ICMSF, 1996).

Em 1987, foi proposto que o gênero *Salmonella* fosse classificado uma única espécie, *S. enterica*, dividido em 7 subespécies (I a VII), baseadas em hibridização DNA/DNA ou propriedades bioquímicas. Cada subespécie seria dividida em sorovars, baseados nos antígenos O e H. Os sorovars poderiam ser divididos através de características bioquímicas (biovar ou biotipo), resistência aos bacteriófagos (fagovars ou lisotipos), antibióticos ou metais pesados, sensibilidade ou pela produção de bacteriocinas (ICMSF, 1996). Segundo Ekperigin e Nagaraja (1998), as propriedades de aglutinação dos antígenos são usadas para diferenciar os 2.501 sorotipos diferentes. Esses sorotipos não são bioquimicamente definidos e não são considerados espécies distintas, como seus nomes convencionais sugerem (ex.: *S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, etc.). Estes sorotipos estão classificados em 50 grupos, de acordo com o antígeno O envolvido e podem ser subdivididos de acordo com biotipagem, fagotipagem e identificação plasmidial.

Segundo Guibourdenche et al. (2010), o gênero *Salmonella* consiste somente de duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo esta última dividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae*, *S. enterica* subespécie *indica*. Os sorovars pertencentes à *S. enterica* subsp. *enterica* são designados por um nome geralmente relacionado com o local geográfico do seu primeiro isolamento. Este nome é escrito em letras romanas normais (não em itálico) e a primeira letra em maiúsculo. Sorovars pertencentes às outras subespécies e a espécie *S. bongori* são designados por seus antígenos, seguidos do nome da subespécie, no total de 2610.

O crescimento da *Salmonella* pode ser evitado se o alimento for mantido sob refrigeração abaixo de 5°C. A temperatura ótima de crescimento está na faixa de 35-43°C e a máxima é de até 49,5°C. Assim, alimentos quentes devem ser mantidos acima dessa temperatura e, embora 55°C já seja uma temperatura segura, 63°C é a recomendada em regulamentações (ICMSF, 1996). A habilidade de crescer em temperaturas abaixo de 7°C depende do sorovar envolvido. Cepas de *S. Typhimurium* são capazes de crescer em temperaturas entre 5 e 6°C e as de *S. Agona*, abaixo de 6°C (VARNAM; EVANS, 1991).

Em relação aos fatores intrínsecos de um alimento, a atividade de água (aa) pode afetar o crescimento de *Salmonella*, sendo seu valor mínimo igual a 0,94 (aa ótimo: 0,99). Esse micro-organismo pode viver um ano ou mais em alimentos com baixa aa, como chocolate, pimenta e gelatina (ICMSF, 1996). Em relação ao pH, o valor mínimo para o crescimento é 3,8 e o máximo, 9,5, sendo o ótimo entre 7 e 7,5 (ICMSF, 1996).

O período de incubação da salmonela varia de 5 horas a 5 dias, mas os sintomas geralmente ocorrem entre 12 e 36 horas, após a ingestão do alimento contaminado. Períodos menores de incubação são associados com a susceptibilidade do indivíduo, o sorotipo envolvido, sua virulência e o número de células viáveis presentes no inóculo. A maioria dos sorotipos de *Salmonella* não apresentam predileção por um hospedeiro em particular, sendo capazes de afetar diferentes espécies de animais e o homem. Entretanto, alguns sorotipos parecem ser adaptados a hospedeiros específicos, como a *Salmonella* Gallinarum-Pullorum (esse sorotipo consiste de dois biotipos, tradicionalmente chamados de S. Gallinarum e S. Pullorum) que causam febre tifóide em frangos e perus, mas não em bovinos (ICMSF, 1996; EKPERIGIN; NAGARAJA, 1998).

A dose mínima infectante (DMI) para o homem é incerta, pois o número de micro-organismos necessários para a produção de sintomas pode variar entre 10 a 1 milhão de células. Essas variações parecem ocorrer devido à susceptibilidade do indivíduo, ao tipo de alimento e ao sorotipo envolvido. Outro problema na verificação correta da DMI de *Salmonella*, a fim de assegurar a qualidade do alimento é que o micro-organismo consegue se multiplicar nesse substrato. Em consequência, muitos países exigem a ausência de *Salmonella* no produto final, inclusive o Brasil (NOTERMANS; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, 1992; BRASIL, 2001).

Os sintomas incluem diarreia, náusea, dores abdominais e febre. A diarreia pode variar de amena a evacuações maciças, podendo causar desidratação. Algumas vezes, foram descritos sintomas como prostração, anorexia, dor de cabeça e choque. O quadro é auto limitado e, em geral, cessa em 2-5 dias. Casos de óbitos são raros, ocorrendo em indivíduos muito jovens, muito idosos ou muito debilitados (EL-GAZZAR; MARTH, 1992, ICMSF, 1996).

2.3.2. Produção de biofilme

As bactérias presentes nos alimentos, além de favorecerem a deterioração e/ou redução da vida útil desses produtos, podem veicular patógenos, trazendo riscos à saúde do consumidor. Assim, a higiene correta no processamento e manipulação desses alimentos é necessária para garantir sua segurança em todos os estágios de produção, minimizando a preocupação com a saúde pública (CORTEZ, 2003).

Falhas no processo de higienização permitem que resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potenciais fontes de contaminação na indústria de alimentos. Os micro-organismos podem aderir às superfícies, interagindo com as mesmas e iniciando a multiplicação celular (Oliveira et al., 2006). Quando a massa bacteriana é suficientemente espessa para agregar nutrientes, resíduos e outros organismos, o biofilme está estabelecido (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

No século 17, Anton van Leeuwenhoek construiu um microscópio, através do qual ele observou uma placa de biofilme formada em seus dentes, denominando-a de "animalculi", unidades capazes de produzir uma comunidade microbiana. No entanto, somente na década de 1970, foi desenvolvida a idéia de que bactérias sésseis poderiam existir sob a forma de biofilme, constituindo um dos principais componentes da biomassa bacteriana em muitos ambientes (COSTERTON et al., 1978). A partir dos anos 80 surgiu a concepção de que bactérias associadas entre si organizavam-se de forma elaborada (Lawrence et al., 1991).

Assim, micro-organismos podem existir no ambiente como células planctônicas ou em comunidades formando os biofilmes. Na forma de tal matriz, as células podem estar ligadas à uma superfície de forma compacta, incluídas nessa rede hidrofóbica predominantemente composta por polissacarídeos (DONLAN, 2002). Essa matriz é formada por células bacterianas sésseis que foram aleatoriamente aderidas (COSTERTON et al., 1987), passando por um processo de diferenciação que transforma pequenos grupos de bactérias aderidas em uma comunidade de biofilme espesso, em uma superfície colonizada (STOODLEY et al., 2002).

Caiazza e O'Toole (2004) sugeriram que as bactérias, em resposta às mudanças das condições ambientais são capazes de alternar entre um estado de vida livre, virulenta e um estado aderido, menos virulentos. Outros estudos indicaram que essa mudança de estado de vida livre para o modo de biofilme coincide com uma mudança no metabolismo (HAMILTON et al., 2009; WHITE et al., 2010).

O lipopolissacarídeo (LPS) é um importante componente da membrana externa das bactérias Gram negativas, que desempenha um papel na fixação inicial na superfície. Foi demonstrado que o LPS confere propriedades hidrofílicas à célula bacteriana. O estado fisiológico das células também influencia a hidrofobicidade e o grau de aderência bacteriana. Bower et al. (1996) observaram que esporos aderiram mais rapidamente que as células vegetativas nas superfícies de contato, devido à maior hidrofobicidade da superfície celular.

A matriz do biofilme é um ambiente complexo formado por proteínas, DNA, RNA, íons e polímeros polissacarídicos (BRANDA et al., 2005).

Os polissacarídeos estão frequentemente envolvidos no estabelecimento de produção de biofilme por interações célula-célula (BRANDA et al., 2005). Apêndices extracelulares filamentosos como flagelos e fímbrias são produzidos por muitas células e desempenham um papel complementar no processo de adesão (HARBRON; KENT, 1988).

Assim como outras bactérias patogênicas, as salmonelas possuem fímbrias, que consistem em apêndices de membrana mais curtos que os flagelos. São compostas por apenas uma proteína estrutural, a pilina, dispostas de maneira helicoidal na superfície das bactérias Gram negativas (TORTORA et al., 2010). Segundo Sauer et al. (2001), as fímbrias e estruturas associadas tem se mostrado importantes na adesão e colonização de superfícies, sendo importantes na interação bactéria-hospedeiro, na persistência ambiental, na formação de biofilmes e colonização e invasão de células (GIBSON et al., 2007). Tais estruturas possuem resíduos hidrofóbicos de aminoácidos (ROSENBERG; KJELLEBERG, 1986), contribuindo para a hidrofobicidade da célula bacteriana com as superfícies e auxiliando ainda mais na agregação de novas bactérias. A principal função das fímbrias é superar a barreira de

repulsão eletrostática inicial que existe entre uma célula e o substrato (CORPE, 1980).

Diferentes sinais ambientais, como a osmolaridade, temperatura, O₂, CO₂, pH, compostos nitrogenados, disponibilidade de nutrientes e concentrações de íons inorgânicos vão gerar respostas nas regulações gênicas das bactérias (GUINEY, 1997), como por exemplo, na formação do biofilme.

Hamilton et al. (2009) estudaram os perfis transcriptômico e proteômico de biofilmes de *Salmonella* Typhimurium. Vários genes e proteínas envolvidas na fixação bacteriana, motilidade, detecção e resposta a disponibilidade de oxigênio, regulação gênica global, transporte e resposta ao estresse foram encontrados sendo diferentemente expressos em biofilmes, quando comparados às células planctônicas. Curiosamente, também vários genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos mostraram-se diferentemente expressos (HAMILTON et al., 2009).

Fímbrias e celulose estão entre os principais componentes da matriz em biofilmes de *Salmonella*. Os genes *agf* (agregative fímbrias) envolvidos na biossíntese de fímbrias, também referidos como *csg*, são organizados em dois operons, o *agfBAC* e o *agfDEFG* (COLLINSON et al., 1996). O segundo componente da matriz extracelular dos biofilmes de *Salmonella* é a celulose, produzida pelos genes *bcsA*, *bcsB*, *bcsZ* e *bcsC* (síntese de celulose bacteriana). Na produção de fímbrias, co-regulada pelo regulador tipo *LuxR*, o *agfD* vai regular indiretamente a produção de celulose, atuando no gene *adrA*, (ROMLING et al., 2000, ROMLING, 2002; ZAKIKHANY et al., 2010). A co-expressão dos dois componentes da matriz extracelular dos biofilmes de *Salmonella* leva à formação de uma rede altamente hidrofóbica com células compactadas, alinhadas em paralelo formando uma matriz rígida.

As fímbrias, associadas com a síntese de celulose em *Salmonella* na formação do biofilme leva à expressão de um fenótipo distinto das colônias em placas de agar Luria Bertani, sendo vermelhas, secas e ásperas (rdar, no inglês *red, dry and rough*) a 28°C, mas não a 37°C (SOLANO et al., 2002; GERSTEL; ROMLING, 2003). A formação de tais colônias se dá por uma mudança de morfologia suave para uma morfologia agregada com a produção dos componentes da matriz extracelular (WHITE, 2006), produzidos em resposta à mudanças ambientais (GERSTEL; ROMLING, 2001). A morfologia

rdar fornece uma maior resistência à dessecação e desinfecção, permitindo uma maior capacidade de sobrevivência dos micro-organismos (ANRIANY et al., 2001; SCHER et al., 2005; WHITE, 2006; APEL, 2009). Hipóteses apontam que a morfologia *rdar* representa um estado crítico na transmissão de *Salmonella* entre os ambientes (GERSTEL; ROMLING, 2001; WHITE; SURETTE, 2006).

Grantcharova et al. (2010) demonstraram que o gene *agfD* é necessário para a maturação do biofilme, porém não atua durante o estabelecimento da colônia bacteriana. Tal gene pode ser visto, portanto, como um ponto de controle da formação do biofilme, regulação da expressão de todos os constituintes principais dessa matriz em *Salmonella* (em condições *rdar*) e controle da transição entre células planctônicas e comportamentos multicelulares. Porém, é importante ressaltar que tal gene possui um nível basal de transcrição (GERSTEL; ROMLING, 2003) e a sua expressão é altamente regulada por diferentes estímulos do ambiente (temperatura, tensão de oxigênio, nutrientes, osmolaridade, etanol, ferro e pH) (GERSTEL; ROMLING, 2001). Além disso, condições ambientais específicas, como a limitação de ferro, também podem causar a expressão de fímbrias, independentemente da temperatura (ROMLING et al., 2003).

Segundo O'Toole et al. (2000), trabalhos com bactérias gram negativas têm demonstrado que a formação de biofilme é prejudicada por mutações em genes envolvidos na mediação da motilidade, na síntese de exopolissacarídeos, adesinas de membrana externa, bem como os reguladores globais de expressão gênica. Quando células de uma colônia *rdar* de *S. Typhimurium* apresentaram mutações no gene *agf*, as colônias formadas foram rosas (pink), morfologia denominada *pdar* (ROMLING et al., 1998; ROMLING; ROHDE, 1999). Por outro lado, a inserção de uma mutação no *adrA*, formou colônias marrons (brown) e a morfologia foi denominada *bdar*. A deleção do *agfD* apresentou colônias brancas e lisas, morfologia denominada *saw* (smooth and white, lisas e brancas) (ROMLING et al., 1998; ROMLING; ROHDE, 1999; ROMLING et al., 2000).

A formação do biofilme pelas células bacterianas oferece tolerância ao estresse incluindo susceptibilidade reduzida aos antibióticos e desinfetantes. Muitos fatores contribuem para essa elevada resistência, incluindo mecanismos

de regulação, o que torna a sua eliminação de instalações de processamento de alimentos um grande desafio (MULCAHY et al., 2008; SIMÕES; VIEIRA, 2009).

Cada vez mais, o aumento da resistência gera um impacto negativo em várias atividades, representando perdas significativas para indústrias (SIMÕES et al., 2003). A formação de biofilmes microbianos pode gerar estragos em equipamentos através da biocorrosão, contaminação de produtos, perdas energéticas relacionadas com o aumento de atrito, resistência acrescida à transferência de calor e perdas de pressão (JASS; WALKER, 2000). Além disso, a formação de tal matriz pode atuar como um substrato para outros micro-organismos menos propensos a formação de biofilme, aumentando a probabilidade da sobrevivência destes e sua disseminação (LAPIDOT et al. 2006).

O tempo de formação do biofilme depende da frequência de limpeza e dos regimes de desinfecção. Superfícies de contato com o alimento devem ser limpas várias vezes por dia, enquanto as superfícies do ambiente, como paredes, geralmente, são limpas somente uma vez. Gibson et al. (1995) relataram que um biofilme recentemente aderido a uma superfície em uma rede de processamento de alimentos foi proveniente de um biofilme antigo que se formou anteriormente em superfícies ambientais.

A limpeza imprópria, assim como a desinfecção de equipamentos realizada de maneira ineficaz estão entre as principais fontes de contaminação dos produtos em uma indústria de alimentos (JESSEN; LAMMERT, 2003). O *design* dos equipamentos em uma indústria alimentícia, assim como a escolha dos materiais de superfície e revestimento são de extrema importância na prevenção da formação de biofilme. Até os programas de saneamento mais eficazes não conseguem compensar as deficiências básicas causada por *design* falhos de equipamentos, com cantos inacessíveis, frestas, fendas, juntas, válvulas e articulações, que são pontos vulneráveis para o acúmulo de biofilme (CHMIELEWSKI; FRANK, 2006). Um programa de saneamento eficaz remove todo material indesejável das superfícies, incluindo micro-organismos, corpos estranhos e resíduos provenientes de produtos de limpeza (Dosti et al., 2005).

Para que o biofilme se desenvolva, deve ocorrer a interação entre as células bacterianas, a superfície a qual elas vão se aderir e a composição do meio (DAVEY; O'TOOLE, 2000; DONLAN, 2002; DUNNE, 2002; STOODLEY et al., 2002). Quanto mais hidrofóbica e áspera a superfície, melhor o desempenho de condicionamento do material, e conseqüentemente, a adesão de bactérias (SIMÕES et al., 2008). Um aumento da concentração de nutrientes também podem favorecer a formação da matriz (SIMÕES et al., 2007).

Biofilmes podem se formar em tubulações do sistema de água, equipamentos industriais e em instalações de processamento de alimentos, onde essas matrizes podem ocorrer em superfícies de manipulação de alimentos ou áreas onde o alimento é armazenado ou correias transportadoras e equipamentos (WONG, 1998; DONLAN, 2002).

Relatos têm demonstrado que as salmonelas conseguem formar biofilmes em superfícies abióticas, como plástico (HURRELL et al., 2009), borracha (ARNOLD; YATES, 2009), cimento (JOSEPH et al., 2001), vidro (SOLANO et al., 2002) e aço inoxidável (MORETRO et al., 2009).

O aço inoxidável é frequentemente utilizado como material de equipamentos em uma planta de processamento de alimentos. A preferência deste material para as superfícies de trabalho e pias de cozinha se deve à sua força mecânica, resistência à corrosão, longevidade e facilidade de fabricação (HOLAH; THORPE, 1990). Além disso, é relativamente resistente ao ataque químico por oxidação e outros agentes sanitizantes (BOULANGE-PETERSON, 1996). Os sistemas de tubulação nos aviários normalmente são feitos de PVC e aço inoxidável. Foi relatado que a tubulação de PVC e os bicos dos bebedouros das aves podem abrigar biofilmes (TRACHOO et al., 2002). Em açougues, revestindo reservatórios, e nas residências, constituindo superfícies de corte e potes, o vidro é amplamente utilizado.

O aumento no consumo da carne de aves, em decorrência do aumento do preço de outras fontes protéicas de origem animal e pela alteração de hábitos alimentares da população (VALERIANO et al., 2003), associada a possível presença de micro-organismos patogênicos em biofilmes (DONLAN; COSTERTON, 2002), aponta para a necessidade do estudo de cepas portadoras dos genes responsáveis pela produção de biofilmes em materiais

utilizados na indústria e também das características do ambiente, fatores como pH, temperatura e de nutrientes (SHI; ZHU, 2009). A presença de *Salmonella* como patógeno e produtora de biofilmes nas indústrias de alimentos é motivo de preocupação por parte dos órgãos responsáveis pela inspeção de produtos de origem animal e saúde pública (JOSEPH et al., 2001), mas poucas são as pesquisas realizadas com *Salmonella* para a produção de biofilme em vidro, aço inox e PVC.

Em 1999, logo após a defesa do Doutorado, meu primeiro projeto foi com *Salmonella* (FAPESP Nº 99/04239-9), onde além da pesquisa dessa bactéria em frango, também analisamos a sensibilidade e especificidade de meios cromogênicos, em relação aos meios de plaqueamento clássicos, o que gerou o artigo **Rall et al. (2005)**.

Nesse projeto, foram analisadas 100 amostras de diferentes pedaços do frango e cada amostra foi inoculada em 3 meios de enriquecimento, o caldo Selenito cistina (SC), caldo Tetrionato (TT) e caldo Rapaport-Vassiliadis (RV). Cada caldo foi plaqueado em meios clássicos, como o Salmonella-Shigella (SS), Verde Brilhante (VB) e Xilose- Lisina- Desoxicolato (XLD), além de dois cromogênicos, o Rambach e o CHROMagar.

O meio líquido de pré enriquecimento não é inibitório e permite o crescimento de toda a microbiota presente. Para sobreviver à toxicidade do meio seletivo de enriquecimento, o pré enriquecimento deve resultar num aumento de pelo menos, 10^5 UFC/ml de *Salmonella* (BOER,1998). O caldo seletivo inibe o crescimento de outros micro-organismos, enquanto permite o crescimento das células de *Salmonella*. Para este fim, são usadas substâncias químicas (tetrionato, selenito), temperatura e tempo de incubação adequados, permitindo que a proporção de *Salmonella* seja maior em relação a outros micro-organismos, a fim de que ela seja reconhecida quando semeada em meios de cultura diferenciais (BURSE, 1995).

Até 1995, a AOAC recomendava o SC e o TT para alimentos com uma pequena carga microbiana e segundo o Bacteriological Analytical Methods (BAM), estes meios eram aconselhados para todos os alimentos. Atualmente, o BAM (2012) passou a recomendar o uso do caldo RV em alimentos com carga microbiana contaminante alta ou baixa, juntamente com a AOAC (a partir de 1999). Atualmente, SC é recomendado somente na análise de goma de guar.

O TT continua sendo usado como o segundo caldo de enriquecimento, devendo ser incubado a 43°C para a análise de alimentos com alta carga microbiana e a 35°C, para baixas cargas, incluindo a goma de guar.

O caldo RV têm-se apresentado como um meio de enriquecimento mais eficiente que o TT e o SC quanto à recuperação de *Salmonella*, a partir de carne fresca e outros alimentos muito contaminados (JUNE et al., 1996). Alguns autores observaram diferenças na performance de RV entre várias marcas comerciais devido a alterações na concentração de MgCl₂ e ao tipo de peptona utilizada (MAIJALA e tal, 1992). Esse caldo deve ser incubado a 42°C, pois esta temperatura aumenta a seletividade quando comparada à temperatura de 35-37°C.

Os meios clássicos de plaqueamento para a detecção *Salmonella* podem ser divididos em três grupos, de acordo com o agente seletivo usado. São eles, ágar com sais biliares, com verde brilhante e com sulfito bismuto. O primeiro grupo apresenta a maior variação e compreende o ágar desoxicolato-citrato, o *Salmonella-Shigella* (SS), o Hecktoen Enteric (HE) e o xilose-lisina-desoxicolato (XLD). O segundo grupo representa o ágar Verde Brilhante (VB) e suas modificações e o terceiro, o ágar sulfito bismuto (BURSE, 1995). Esses meios se baseiam na fermentação da lactose e, às vezes, também na produção de ácido sulfídrico (H₂S) em combinações com várias concentrações de inibidores para o isolamento e identificação presuntiva de *Salmonella* (ANDREWS, 2001). Os meios que utilizam estas características apresentam várias limitações, pois a detecção de H₂S é variável, dependendo da taxa de produção, da concentração de oxigênio na colônia, do pH e da concentração de ferro no meio. A capacidade de produção de ácido sulfídrico juntamente com o teste da produção de ácido a partir da fermentação da lactose é inadequada para diferenciar *Salmonella* sp de outras bactérias presentes no alimento, especialmente espécies de *Proteus*, que apresentam o mesmo perfil de *Salmonella* quanto a esses dois testes, sendo também lactose negativo e produtor de H₂S. Essa falta de coloração específica da colônia pode resultar em falhas no isolamento de *Salmonella* (RAMBACH, 1990).

Devido às limitações dos meios clássicos, foram desenvolvidos meios cromogênicos que permitem a melhor visualização de colônias suspeitas

através de colorações específicas das mesmas, amplamente utilizados atualmente.

Rambach (1990) desenvolveu o agar Rambach, um meio cromogênico, baseado em uma característica fenotípica diferente: a formação de ácido a partir da metabolização do propilenoglicol, observando que esta característica poderia ser usada no lugar do teste de produção de H₂S na identificação de *Salmonella*. Bactérias lactose-positivas poderiam ser identificadas pelo uso de um indicador cromogênico de β-galactosidase, diferenciando *Salmonella* destes outros micro-organismos. O desoxicolato foi acrescentado como inibidor de bactérias Gram positivas. O indicador de pH utilizado é o vermelho neutro que, em ambiente ácido, devido à metabolização do propilenoglicol, confere cor vermelha às colônias de *Salmonella*. Segundo este autor, colônias positivas para o propilenoglicol apresentam-se vermelhas, enquanto que as positivas para a β-galactosidase são azuis. Bactérias capazes de utilizar essas duas substâncias desenvolvem coloração violeta e bactérias que não utilizam nenhuma das duas, apresentam colônias incolores. Entre os sorotipos de *Salmonella*, somente a *S. Typhi* mostrou-se incapaz de desenvolver coloração vermelha, pois não degrada o propilenoglicol, assim como não é produtora de H₂S e embora cresça nesse meio, desenvolve colônia incolor. O autor testou cem amostras de *Salmonella* non-Typhi e 97 delas apresentaram coloração vermelha. *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris* e *Morganella morganii* formaram colônias incolores.

Outro meio cromogênico testado foi o CHROMagar *Salmonella* (CAS), no qual este micro-organismo apresenta coloração malva (lilás claro), enquanto que as colônias de outros membros da família Enterobacteriaceae são azuis ou incolores. Gaillot et al. (1999) testaram 501 cepas de *Salmonella*, isoladas de fezes, que faziam parte de uma coleção de culturas e que estavam agrupadas em 38 sorovars. Os autores compararam o ágar CAS e o Hektoen (HE) e observaram que todas as 501 cepas testadas produziram colônia malva em 18 horas, enquanto no ágar HE, 496 (99%) apresentaram-se como colônias verdes com o centro negro, biotipo característico de *Salmonella*. O CAS apresentou número de colônias falso-positivas significativamente menor (54), quando comparado com o HE, com 105 colônias características de *Salmonella*, mas não confirmadas. Os micro-organismos falso-positivos isolados a partir do

CAS foram *Candida albicans* (30), *Pseudomonas aeruginosa* (23) e *Aeromonas hydrophila* (1). No ágar HE, a espécie falso-positiva predominante foi *Proteus mirabilis* (88), seguida de *Citrobacter freundii* (14) e em menor quantidade, *E. coli* (2) e *Shewanella putrefaciens* (1).

A partir das 100 amostras de frango analisadas no nosso Laboratório, 29 foram positivas para *Salmonella*, que foi recuperada em sete amostras (24,1%), na utilização do caldo SC (0,06). No TT (0,17) e RV (0,19), a porcentagem de isolamento foi maior, de 58,6% (17 amostras) e 69% (20 amostras), respectivamente. O TT e RV não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si (0,17 e 0,19, respectivamente, $p > 0,05$), mas ambos foram melhores que o SC (0,06), utilizando-se o teste de Cochran, para comparação de proporções para amostras dependentes (ZAR, 1996).

June et al. (1995) e Hammack et al. (1999) também observaram a superioridade do RV (42°C) e do TT (42°C) sobre o SC, na recuperação de *Salmonella*, a partir de carne fresca e outros produtos altamente contaminados. Blivet et al. (1997) também observaram fraco desempenho do SC em relação ao RV, pois analisando 100 amostras de frango, ovos e peru, encontraram *Salmonella* em 83 delas e o RV foi responsável por 97,6% das amostras positivas, enquanto o SC, por 42,2%. Entretanto foi notado que o caldo SC detectou baixos números (10 a 50 UFC/ml) de alguns sorotipos, como *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhi* e *S. Paratyphi* enquanto o RV também detectou baixos números de *S. Pullorum* e *S. Paratyphi*, mas para *S. Gallinarum* e *S. Typhi*, a detecção ocorreu em concentrações maiores, de 10^4 e 10^6 UFC/ml, respectivamente. Neste trabalho, o caldo SC foi o meio que apresentou a menor recuperação de *Salmonella* e estes dados estão de acordo com o de outros pesquisadores (BAILEY et al., 1998; HUMBERT et al., 1997)

Entretanto, Arroyo e Arroyo (1995) pesquisaram 264 amostras de frango e ovelhas, encontrando *Salmonella* em 83 delas (31,4%), utilizando os caldos TT (37°C), RV (42°C) e SC (37 e 43°C). Observaram que o SC, em qualquer temperatura de incubação, apresentou maior eficácia de isolamento em relação ao TT ou RV. Em 1997, HOFF et al. (1997) também observaram um melhor desempenho do SC em relação ao TT.

Os meios cromogênicos, em relação aos clássicos, apresentaram maior eficiência na detecção de *Salmonella*, além do menor número de falso

positivos. A partir do CHROMagar (Figura 12), ocorreu o isolamento de *Salmonella* em 79% das amostras positivas (23 em 29), seguido pelo Rambach com 48% (Figura 13), ambos cromogênicos. Seguido pelo XLD (34,5%), SS (27,6%) e VB (13,8%) (Figuras 14, 15 e 16, respectivamente). Utilizando-se o teste de Goodman para comparação em distribuições multinomiais (ZAR, 1996), pode-se verificar que CHROMagar (0,550) foi mais eficiente que o Rambach (0,210), que foi mais eficiente que os meios clássicos, que não diferiram entre si (SS: 0,065; VB: 0,025 e XLD: 0,057).

Entre os meios clássicos, não estatisticamente, mas biologicamente o XLD foi o melhor meio de plaqueamento, resultados também observados por Rhodes e Quesnel (1986) e Moringo et al. (1989). Entretanto, os últimos autores obtiveram melhor recuperação a partir do SS do que do VB.

O CHROMagar (CAS) foi estatisticamente melhor que o Rambach. Estes dados estão em acordo com os encontrados por Narquet e Roupas (1996a), quando, num primeiro trabalho compararam o CAS e o Rambach quanto à eficiência de detecção de *Salmonella* a partir 36 amostras de peles de frango e observaram positividade em 33 amostras no CAS e em 29 no Rambach. Em outro estudo (1996b), estes autores analisaram 149 amostras de alimentos, das quais 20 estavam contaminadas, sendo que 19 foram detectadas pelos dois meios e CAS detectou mais uma amostra, negativa no Rambach.

Gaillot et al. (1999) testaram o CAS e o Hecktoen Enteric Agar (HE), que embora não tenha sido incluído neste estudo, é um meio clássico de detecção, sendo enquadrado no mesmo grupo do SS, que apresentam sais biliares em sua composição. Comparando os dois meios, foram analisadas 508 amostras de fezes, das quais 20 revelaram-se positivas para *Salmonella*. Dessas 20, 19 e 16 foram isoladas pelo CAS e pelo HE, respectivamente. Além disso, o número de falso-positivos foi menor no CAS (54) quando comparado com o HE (105).

Embora em número bem menor, falso-positivos também ocorreram nos meios cromogênicos, principalmente no Rambach, onde 21% das 157 cepas características foram confirmadas como *Salmonella*. Isto se deveu ao grande número de cepas de *Proteus* e *Citrobacter* que também podem apresentar a cor vermelha neste meio. Segundo Rambach (1990) estes gêneros deveriam

apresentar coloração azul, mas colônias vermelhas também foram observadas por Garrick e Smith (1994) e Gaillot et al. (1999). No presente trabalho, foram isoladas cepas de *Proteus* que apresentaram o mesmo perfil de *Salmonella* e cepas que apresentaram a coloração esperada, de amarelo claro, quase incolor, entretanto isto só foi observado após 48 horas de incubação

O CHROMagar foi o meio que apresentou menor número de cepas falso-positivas, onde 82 de 149 (55%) foram identificadas como *Salmonella*. A colônia característica nesse meio é de cor malva (lilás claro) e a maioria das enterobactérias desenvolve cor azul, inclusive *Proteus* e *Citrobacter*. Entre os falso-positivos, foi identificada a *Pseudomonas aeruginosa* e outros bastonetes Gram negativos não pertencentes à Família Enterobacteriaceae. Gaillot et al. (1999), também observaram a presença de *Pseudomonas aeruginosa* e de *Aeromonas hydrophila*, sendo que os bastonetes observados neste trabalho podem pertencer a esta espécie. No entanto, nenhuma das colônias falso-positivas isoladas pertencia ao gênero *Proteus* ou *Citrobacter*.

Assim, segundo nossos resultados, para se obter uma máxima eficiência, seria recomendado a utilização de, pelo menos, um meio cromogênico. O CHROMagar foi o mais eficiente, pela maior detecção de *Salmonella* e pelo menor número de falso-positivos. Além disso, segundo a literatura (GAILLOT et al., 1999), as colônias de *Salmonella* Typhi também se apresentaram de coloração malva, característica desse meio e não incolores como acontece no Rambach, onde as colônias suspeitas de salmonellas são vermelhas.

Os meios cromogênicos apresentaram maior sensibilidade do que os clássicos e essa característica compensa o valor elevado desse tipo de meio de cultura, além da menor quantidade de cepas falso-positivas, que geram gasto de tempo e de meios de cultura para identificação.

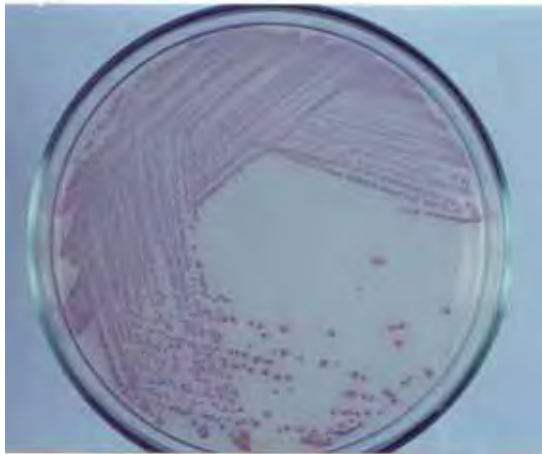


Figura 12. Colônias características de *Salmonella* no ágar CHROMagar

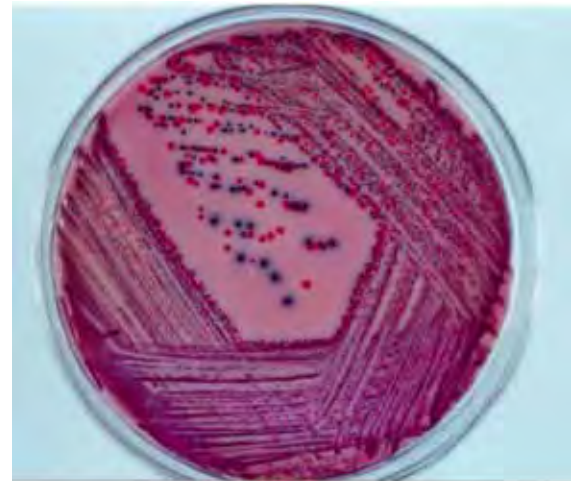


Figura 13. Colônias características de *Salmonella* no ágar Rambach

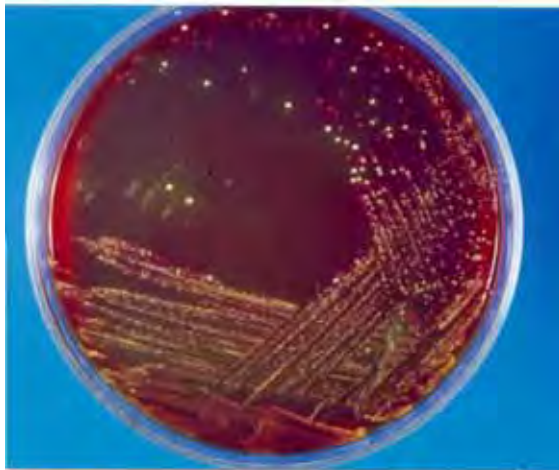


Figura 14. Colônias características de *Salmonella* no ágar XLD

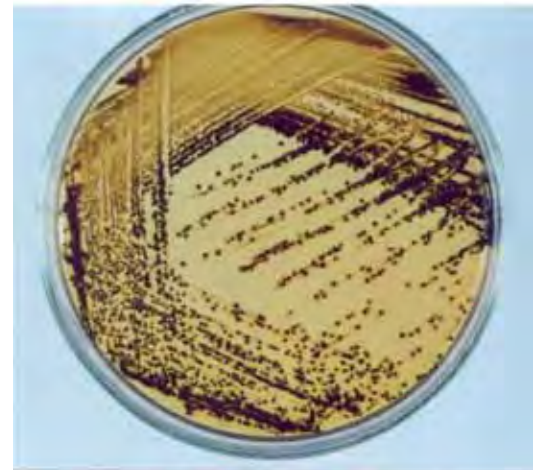


Figura 15. Colônias características de *Salmonella* no ágar SS

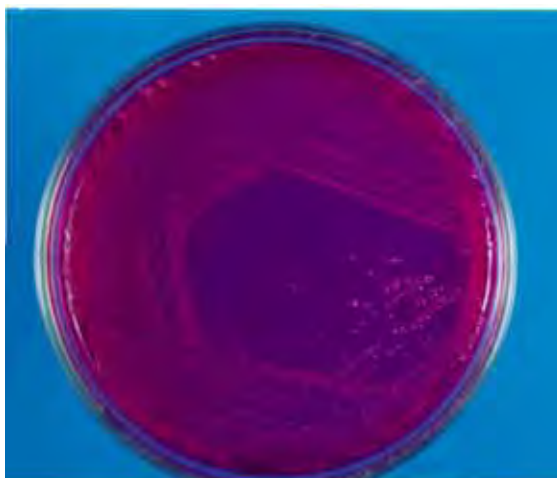


Figura 16. Colônias características de *Salmonella* no ágar VB

Em 2006, pela introdução de técnicas moleculares no nosso laboratório, desenvolvemos também o diagnóstico pela PCR para *Salmonella*, que gerou o artigo **Rall et al. (2009)**.

Analisamos 50 amostras de carne de frango e 75 de lingüiças frescas, procedentes de nove estabelecimentos diferentes da cidade de Botucatu, pela metodologia tradicional e pela PCR, que era realizada a partir dos dois caldo de enriquecimento utilizados, o tetracionato e o Rapaport-Vassiliadis.

Optamos por esses alimentos, pois o hábito de consumo de carne de frango por parte dos brasileiros vem mudando devido à queda de preço, à boa qualidade e à praticidade dos produtos oferecidos.

Tendo em vista o grande consumo desse tipo de carne e a tendência mundial de aumento, a qualidade desses produtos é extremamente importante, sendo uma preocupação dos órgãos de saúde pública, das indústrias alimentícias e dos próprios consumidores. As aves criadas para consumo humano podem ser hospedeiras naturais de vários micro-organismos patogênicos, como *Salmonella* sp e *E. coli* (LUCHEY et al. 2000).

No Brasil, a subnotificação de casos de infecções por *Salmonella* representa um grave problema, pois os números divulgados pelos órgãos de vigilância sanitária parecem não corresponder à realidade. Mesmo assim, estimativas sobre a frequência de infecções por *Salmonella* permitem sugerir um coeficiente de casos de 145/100.000 habitantes (BEPa, 2012), número muito superior ao encontrado em países como Portugal, Inglaterra e Alemanha (4,5; 28 e 93,3/100.000 habitantes, respectivamente) (WHO, 2009).

Os métodos convencionais de isolamento usados para *Salmonella* incluem pré-enriquecimento em meio não-seletivo, seguido de enriquecimento seletivo e semeadura em, pelo menos dois ágars seletivos. Colônias suspeitas são confirmadas bioquímica e sorologicamente, somando-se até 7 dias para a obtenção de resultados positivos (BENNET et al., 1998). Além disso, a sensibilidade desta metodologia pode ser menor do que as baseadas na detecção de DNA, devido à inabilidade do crescimento de células injuriadas ou que estiverem no estado “viável não cultivável” (ARNOLD et al., 2004). Por outro lado, métodos moleculares baseados em amplificação de DNA, pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é uma alternativa viável para a detecção

de micro-organismos em amostras de alimentos não processados, sendo a rapidez, especificidade e sensibilidade suas maiores vantagens. Entretanto, a susceptibilidade às substâncias inibitórias presentes em amostras com matrizes complexas, como alimentos, pode ser uma desvantagem. Para se evitar resultados falso-positivos e diluir possíveis substâncias inibidoras, recomenda-se o emprego de, pelo menos, um pré-enriquecimento não seletivo (ARNOLD et al., 2004). Também deve ser considerada, a detecção de moléculas de DNA liberadas pela morte bacteriana, no caso de alimentos submetidos a processamentos térmicos, não sendo o caso de amostras de carnes cruas. *Salmonella* têm-se mostrado bastante sensível a essa ferramenta, necessitando, porém, de procedimentos de enriquecimento para se aumentar essa sensibilidade (DENIS et al., 2001). O método é evidentemente vantajoso se comparado ao convencional, demorado e trabalhoso, visto que a rapidez no diagnóstico da qualidade dos produtos a serem comercializados é de grande interesse das redes de produção de alimentos.

Foram analisadas 50 amostras de carne de frango, onde 35 (70%) estavam fora dos parâmetros microbiológicos, segundo a RDC nº12 da ANVISA (ANVISA, 2001a) (até 10^4 coliformes a 45°C/g). Embora a pesquisa da presença de *Salmonella* não seja exigida, 4 (8%) amostras também apresentaram o patógeno pela metodologia tradicional. Essa presença foi confirmada pela PCR (Figura 17), que também foi positiva para mais 23 amostras, num total de 27 positivas (54%) nessa metodologia ($z = 4, 757$; $p < 0,001$).

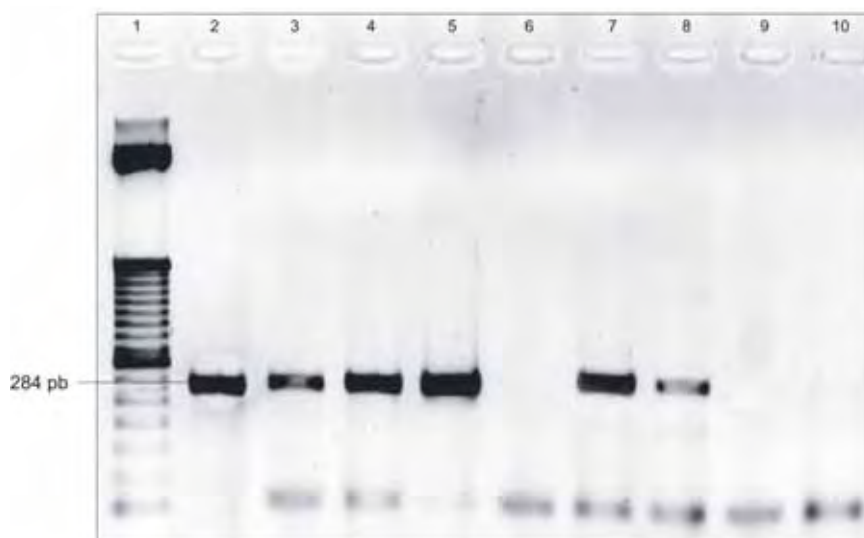


Figura17. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *invA*. Poço 1: marcador de pares de base (50bp); poço 2: *Salmonella* Choleraesuis ATCC 13706; poços 3, 4, 5, 7 e 8: amostras positivas; poços 6 e 9: amostras negativas; poço 10: controle negativo.

Os padrões microbiológicos para lingüiças frescas permitem até 5×10^3 de coliformes a 45°C/g, na ausência de *Salmonella* em 25 g do alimento. Entre as 75 amostras de lingüiças, 30 (40%) estavam fora dos limites permitidos, com 7 amostras positivas para *Salmonella* (9,3%), pela metodologia tradicional. Entretanto, se considerarmos a pesquisa pela PCR, o número de amostras positivas aumenta para 42 (56%) ($z = 5,924$; $p < 0,001$). Somando-se a taxa de frequência de *Salmonella* aos limites microbiológicos para coliformes a 45°C, 86,7% das lingüiças analisadas estavam impróprias para o consumo.

A ocorrência de *Salmonella* em carne de frango (carcaças e cortes) pode variar consideravelmente. Na comparação de resultados, consideram-se vários fatores, como diferenças entre as origens das amostras, método de detecção empregado, período de enriquecimento e contaminação cruzada dos produtos analisados (BRYAN, 1980).

Pela metodologia tradicional, esse trabalho observou frequência de 8% da presença de *Salmonella*. Baú et al. (2001) e Cardoso et al. (2005) apresentaram resultados semelhantes aos encontrados nessa pesquisa, com a presença de *Salmonella* em, respectivamente, 10,5% e 11,4% das amostras analisadas. Carvalho et al. (2005) relataram taxas maiores, de 20% de positividade.

A maioria dos trabalhos publicados que apresenta níveis de frequência de *Salmonella* não ultrapassa 30% em amostras de carne de frango, utilizando-se a metodologia tradicional. No Brasil, Gonçalves et al. (1998) observaram que 26,7% das amostras procedentes do estado do Rio de Janeiro estavam contaminadas com o patógeno. Valor semelhante foi observado na Inglaterra por Jorgensen et al. (2002), que encontraram 25% de amostras positivas. Em Maryland, Estados Unidos, Myint et al. (2006) observaram taxas que variaram de 22 a 28%.

A positividade foi bem maior quando foi utilizada a PCR como ferramenta. Almeida Filho et al. (2003) encontraram uma taxa de 45% (18/40) de amostras de frango contaminadas por *Salmonella* em Cuiabá, número muito próximo ao encontrado pela presente pesquisa (44%). Castagna et al. (2005) relataram a presença do patógeno em 66% das amostras (25/38) de lingüiças frescas provenientes da região sul do Brasil, número pouco acima do encontrado pelo presente estudo, de 50% (20/40).

Em relação às metodologias empregadas, pode-se concluir que a PCR mostrou-se mais sensível que a tradicional. É importante acrescentar que a metodologia de PCR mostra-se realmente eficaz quando as amostras são submetidas anteriormente a um período de enriquecimento. Myint et al. (2006) obtiveram resultados satisfatórios com um período mínimo de enriquecimento de 8 horas, diferentemente de outros autores que advertem que são necessárias 10 horas, no mínimo, para a plena eficácia da metodologia (SOUJET et al., 1994). O presente trabalho utilizou 24 horas de enriquecimento, tempo igual a metodologia tradicional.

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que esses alimentos representam perigo à saúde dos consumidores, sendo necessárias medidas para um maior controle e fiscalização por parte das autoridades de vigilância sanitária, a fim de que se reduzam os índices de frequência de *Salmonella* em carne de frango e lingüiças frescas.

Em 2010, começamos a pesquisar alguns genes responsáveis pela produção de biofilme por *Salmonella* e a sua produção *in vitro*, pelo projeto **FAPESP 2010/06436-7**.

A produção de biofilme foi pesquisada em diferentes materiais (PVC, vidro e aço inox) e (16°, 20°, 28° e 35°C). Essas temperaturas foram escolhidas porque 35°C é temperatura ótima de crescimento de *Salmonella*; 28°C, a temperatura que esse micro-organismo apresenta a morfologia *rdar*; 16°C é a temperatura recomendada da água do pré *chiller*, nas plantas de abatedouro de aves (BRASIL, 1998) e 20°C é a temperatura dessa água mais próxima ao real, uma vez que grandes quantidades de carcaças de aves a 40°C são simultaneamente acrescentadas nessa etapa e onde a vazão de água não é tão grande, com pouca renovação, ao contrário do que acontece no *chiller*, propriamente dito.

Também observamos diferenças morfológicas entre as colônias, em relação à aparência *rdar*, *bdar saw* e *pdar*.

Entre as 174 cepas de *Salmonella* analisadas, 171 (98,3%) cepas produziram biofilmes em, pelo menos, uma das temperaturas e materiais analisados. Esses resultados estão de acordo com Solano et al. (2002) que

observavam que 97% das cepas também foram positivas. Lu et al. (2011) encontraram um valor um pouco menor, de 63%.

De acordo com Stepanovic et al. (2000), as cepas foram classificadas como não produtoras ou fracamente, moderadamente ou fortemente produtoras.

A produção foi dependente da temperatura e do material analisado, conforme Tabela 8.

Tabela 8. Produção de biofilmes por *Salmonella* spp., isolada de frango, em diferentes materiais e temperaturas.

Material	Temperatura	NP (%)	Fraco (%)	Moderado (%)	Forte (%)	Total de produtores (%)
Aço inox	16	129 (74,2)	42 (24,1)	0	3 (1,7)	45 (25,8)
	20	120 (69)	48 (27,6)	6 (3,4)	0	54 (31)
		135				
	28	(77,6)*	33 (19)	3 (1,7)	3 (1,7)	39 (22,4)
	35	69 (39,7)	96 (55,2)	9 (5,2)	0	105 (60,3)
Vidro	16	153 (88)*	21 (12)	0	0	21 (12)
	20	135 (77,6)	33 (19)	6 (3,4)	0	39 (22,4)
	28	144 (82,8)	15 (8,6)	12 (6,9)	3 (1,7)	30 (17,2)
	35	141 (81)	33 (19)	0	0	33 (19)
PVC	16	96 (55,2)	78 (44,8)	0	0	78 (44,8)
		105				
	20	(60,3)*	69 (39,7)	0	0	69 (39,7)
	28	96 (55,2)	78 (44,8)	0	0	78 (44,8)
	35	60 (34,5)	114 (65,5)	0	0	114 (65,5)

NP: Não produtor; *p<0,001

Analisando-se o material de acordo com a temperatura, nenhuma se destacou como a melhor temperatura para a não produção de biofilme. Em aço inóx, a ausência de biofilmes foi estatisticamente significativa a 28°C. No vidro a 16°C, ocorreu o maior número de cepas que não formaram biofilme, resultado estatisticamente significativo. No PVC, a ausência de produção

ocorreu, de maneira estatisticamente significativa, a 20°C. Nenhum dos materiais diferiram entre si a 35°C.

As propriedades físico-químicas de uma superfície podem influenciar na adesão dos micro-organismos (DONLAN e COSTERTON, 2002). O vidro e o aço inóx são considerados hidrofílicos, enquanto a borracha, plástico e PVC são hidrofóbicos (DONLAN, 2002) e vários autores observaram que *Salmonella* adere melhor a materiais do segundo tipo (SINDE e CARBALLO, 2000; DONLAN, 2002). Isso pode ser observado na Tabela 9, que apresenta os resultados da capacidade de produzir ou não biofilme, dependendo da temperatura. Pode ser observado que o vidro, com características hidrofílicas, foi o material que apresentou menor formação de biofilme em 3 das 4 temperaturas testadas (16, 28 e 35°C). A 20°C, embora não tenha ocorrido diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes materiais, o vidro foi o material com o maior número de cepas não produtoras com 77,6%, seguida pelo aço inóx (também hidrofílico), com 69%, e PVC, com 60, 3%.

Sinde e Carballo (2000), comparando aço inóx com outros materiais mais hidrofóbicos, observaram que *Salmonella* se adere mais facilmente a esse tipo de material do que ao aço inóx. Essa característica também foi observada no presente trabalho, demonstrando que o aço inóx é melhor (pois apresentou baixa produção) do que PVC (mais hidrofóbico).

Embora as diferenças não tenham sido estatisticamente diferentes, pela Tabela 9 pode ser observado que, independente da temperatura, as cepas de *Salmonella* aderiram mais ao PVC (hidrofóbico) se comparado com o aço inóx (hidrofílico). Joseph et al. (2001) também observaram um aumento da produção de biofilmes em plástico quanto comparado ao aço inóx, por cepas de *Salmonella*.

Stepanovic et al. (2003) testaram 30 cepas de *Salmonella* sp e observaram que 97% dos isolados produziram biofilme a 30°C após 48h, seguido pelas temperaturas de 37°C (93%) e 22°C (90%) em placas de poliestireno. Esses autores encontraram maior porcentagem de cepas fortemente produtoras. Interessantemente, apesar da temperatura de 22°C ter apresentado o menor número de cepas produtoras (90%), foi onde ocorreu o maior número de cepas fortemente produtoras (30%).

Tabela 9. Produção de biofilmes por cepas de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango, em três materiais e quatro temperaturas diferentes.

Material	Temperatura	NP (%)	Fraco (%)	Moderado (%)	Forte (%)	Total de produtores (%)
Aço inox	16	129 (74,2)	42 (24,1)	0	3 (1,7)	45 (25,8)
	20	120 (69)	48 (27,6)	6 (3,4)	0	54 (31)
	28	135 (77,6)*	33 (19)	3 (1,7)	3 (1,7)	39 (22,4)
	35	69 (39,7)	96 (55,2)	9 (5,1)	0	105 (60,3)
Vidro	16	153 (88)*	21 (12)	0	0	21 (12)
	20	135 (77,6)	33 (19)	6 (3,4)	0	39 (22,4)
	28	144 (82,8)	15 (8,6)	12 (6,9)	3 (1,7)	30 (17,2)
	35	141 (81)	33 (19)	0	0	33 (19)
PVC	16	96 (55,2)	78 (44,8)	0	0	78 (44,8)
	20	105 (60,3)*	69 (39,7)	0	0	69 (39,7)
	28	96 (55,2)	78 (44,8)	0	0	78 (44,8)
	35	60 (34,5)	114 (65,5)	0	0	114 (65,5)

NP: Não produtor; * $p < 0,001$.

De qualquer maneira, no presente trabalho, pode ser observado, pela Tabela 9, que ocorreu produção de biofilme em todas as temperaturas, independentemente do material e da intensidade da produção. Esses resultados são preocupantes, pois 16°C pode ser considerada uma temperatura relativamente baixa, quando comparada com a ótima de crescimento e mesmo nessas condições, 42 cepas (24,1%) foram produtoras em aço inóx, material usado nos tanques do pré-chiller, cuja temperatura recomendada da água é de 16°C. Também a 20°C ocorreu a produção de biofilmes em todos os materiais. Deve ser considerado que a temperatura de 16°C, apesar de ser a recomendada, dificilmente é mantida, devido a entrada contínua de carcaças a 42°C nesse sistema sendo que 20°C é uma temperatura mais próxima do real. Além disso, deve ser notado que 20°C também é a temperatura média do ambiente das plantas de processamento de aves,

ênfatizando a necessidade de limpeza adequada e regular (Stepanovic et al., 2003).

As diferenças entre os resultados de Stepanovic et al. (2003) podem ser explicadas pela diferença de métodos, dos materiais e da origem das cepas, uma vez que, no presente estudo, foram usadas cepas isoladas de frangos e no de Stepanovic et al. (2003), foram testados isolados de humanos, outros animais e alimentos não especificados. Entretanto, Stepanovic et al. em 2004, usaram 122 cepas de *Salmonella* de mesma origem do trabalho de 2003, na pesquisa da produção de biofilme em placas de poliestireno, mas usando um meio de cultivo diferente, o mesmo do presente trabalho e observaram produção em somente 1,6% das cepas a 28°C., valores bem semelhantes aos obtidos nesse trabalho, de, 1.7%.

Pode-se dizer que a discussão dos resultados foi fortemente afetada pela escolha dos materiais utilizados para os testes de adesão. Como já explicado, o aço inóx foi escolhido (hidrofílico), pela sua presença na maior parte das superfícies numa planta de processamento de aves, o PVC (hidrofóbico) é usado no encanamento da rede de abastecimento e na "biqueira", que fornece água para as aves. O vidro (hidrofílico) está presente nos pontos de venda, principalmente nas portas deslizantes dos balcões refrigerados e na casa dos consumidores, que usam o vidro como superfície de corte. Entretanto, a maioria dos artigos publicados, após extensa revisão bibliográfica, usa o poliestireno, material das microplacas, que também é hidrofóbico, como o PVC, mas não sendo possível uma comparação com materiais hidrofílicos como aço inóx e vidro. Além disso, não existem dados sobre as diferenças dos graus de hidrofobicidade entre o PVC e o poliestireno, não sendo possível uma real comparação entre esses materiais, quanto à produção de biofilme por *Salmonella*.

Aliás, alterações na capacidade de adesão (primeiro passo na produção de biofilmes), no mesmo material foram observadas Stepanovic et al. (2003), que testaram quatro marcas diferentes de placas de poliestireno, sendo que três delas tinham superfícies tratadas, que permitiam uma melhor adesão, usadas para a formação de tapetes celulares, em cultura de células, mas que também facilitavam a adesão bacteriana e a formação de biofilme.

Além disso, trabalhos que utilizaram aço inóx ou vidro testaram somente 2 ou 3 cepas e o objetivo desses trabalhos era a manipulação genética de cepas sabidamente positiva (LATASA et al. 2005; MALCOVA et al., 2008; KIM e WEI, 2009) ou era testar a resistência dessas cepas produtoras de biofilme à sanitizantes, comparando-as com células bacterianas planctônicas (SINDE; CARBALLO, 2000; JOSEPH et al., 2001; RAMESH et al., 2002; ASSERÉ et al., 2008; Marin et al., 2009).

Turki et al. (2011), apesar de ter analisado a produção de biofilme em vidro por outro método, observaram que 96,5% das 57 cepas de *Salmonella* não produziram biofilme a 4°C. No presente trabalho, a menor temperatura usada foi 16°C, mas também foi observado que a maioria das cepas não produziu biofilme (88%).

As fotos de microscopia eletrônica confirmaram a produção de biofilmes, nos três materiais e temperaturas utilizados, conforme Figuras 18, 19 e 20.

Pelos resultados obtidos, podemos concluir que a formação de biofilmes por cepas de *Salmonella* está correlacionada, mas de forma independente, com as temperaturas e materiais utilizados.

Esse trabalho também analisou a presença dos genes *adrA* e *agfD* e a morfologia dessas cepas e entre as 174 cepas de *Salmonella* spp., todas foram positivas para a presença dos genes *agfD* (Figura 21) e *adrA* (Figura 22).

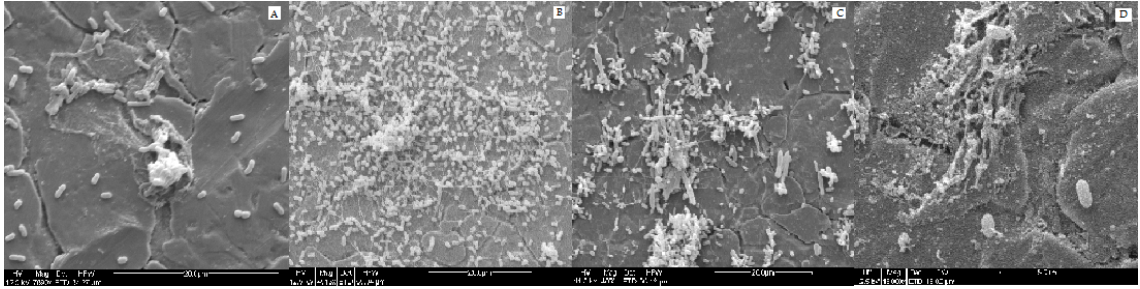


Figura 18. Biofilme de *Salmonella* spp. produzido em aço inóx. (A) 16°C, (B) 20°C, (C) 28°C, (D) 35°C.

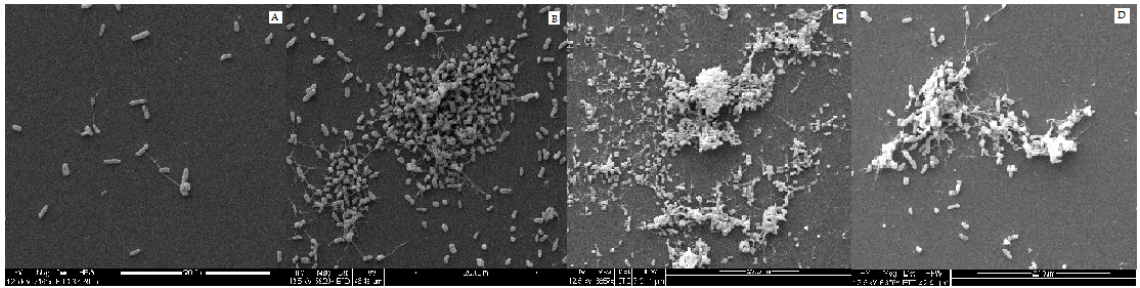


Figura 19. Biofilme de *Salmonella* spp. produzido em vidro. (A) 16°C, (B) 20°C, (C) 28°C, (D) 35°C.

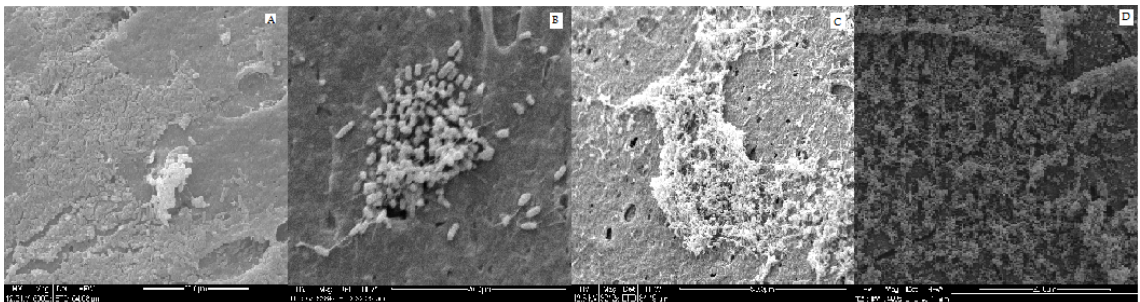


Figura 20. Biofilme de *Salmonella* spp. produzido em PVC. (A) 16°C, (B) 20°C, (C) 28°C, (D) 35°C.

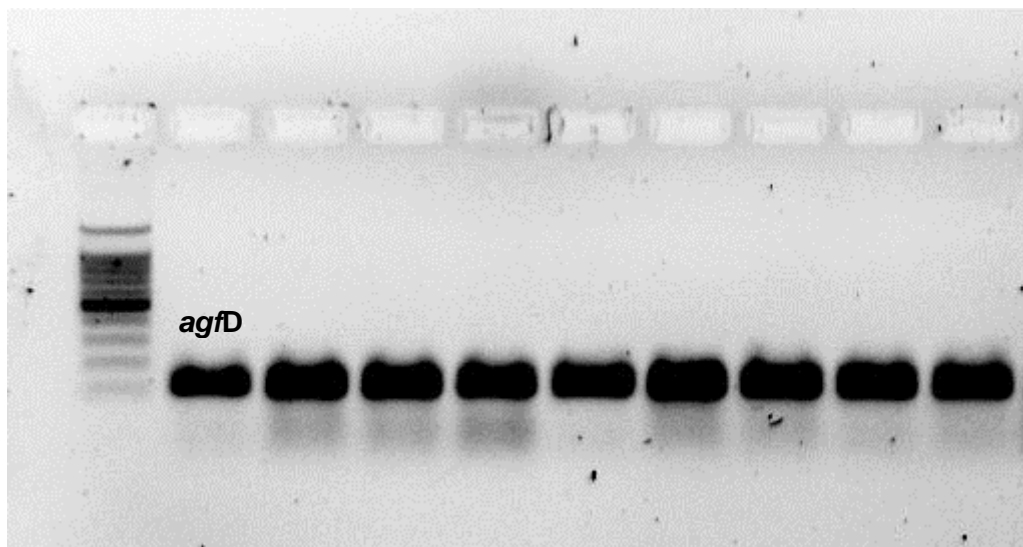


Figura 21. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *agfD*. Poço 1: marcador de pares de base (100bp); poço 2: *Salmonella* Typhimrium ATCC 14028 (123 pb); poços 3 a 10: amostras positivas.

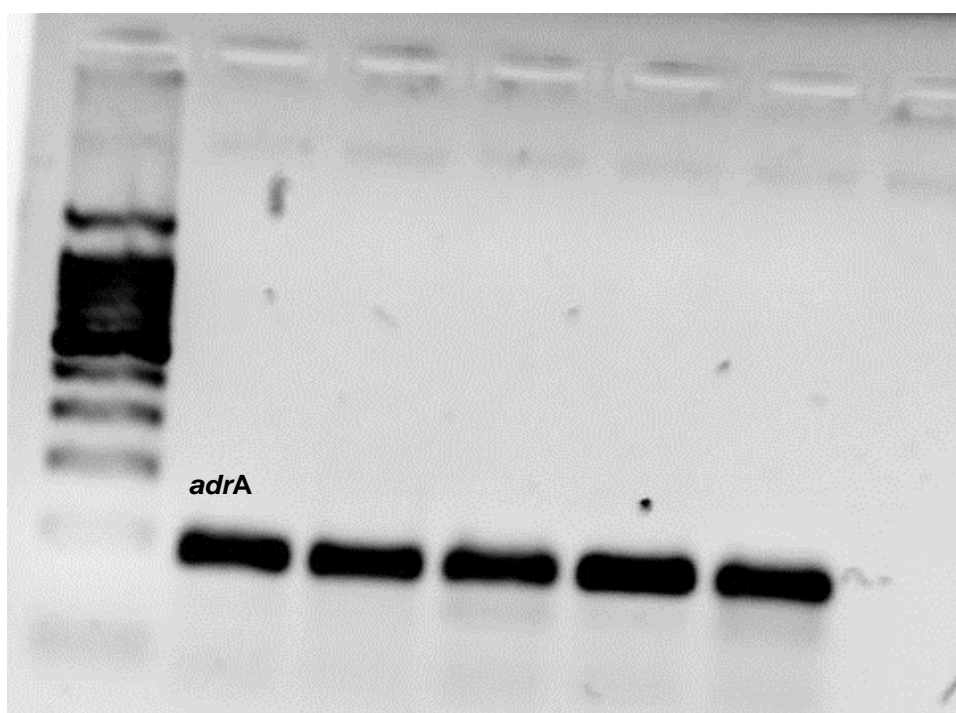


Figura 22. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *adrA*. Poço 1: marcador de pares de base (50bp); poço 2: *Salmonella* Typhimrium ATCC 14028 (92 pb); poços 3 a 6: amostras positivas; 7: controle negativo.

Entre as 174 cepas analisadas, na temperatura de 28°C, 54 (31%) foram incapazes de desenvolver colônias típicas em caldo Lúria Bertoni, enquanto 120 (69%) apresentaram um dos tipos morfológicos observados por Romling e Rohde (1999) e Romling (2000), sendo que 96 (55,2%) apresentaram a morfologia *rdar*, 21 (12,1%) a *bdar* e 3 (1,7%), a *saw*. Nenhuma amostra apresentou a morfologia *pdar* (Figura 23). A 35°C, 57 (32,8%) produziram a morfologia *rdar*, 3 (1,7%), a *bdar* e 3 (1,7%), a *saw*.

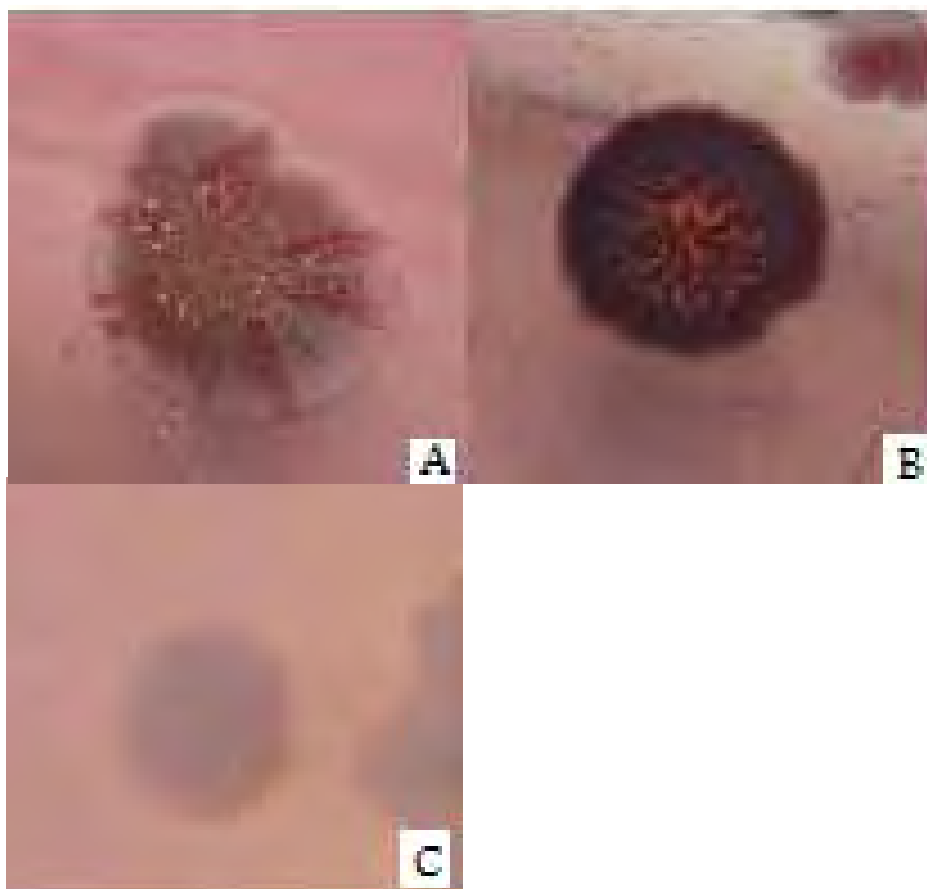


Figura 23. Diferentes tipos morfológicos apresentados pelas cepas de *Salmonella* spp em caldo LB. Isoladas de frango, crescido em agar LB, a 28°C. A: *rdar*; B: *bdar*; C: *saw*.

Embora todas as cepas tenham sido positivas para os genes pesquisados, associados à produção de biofilme, nem todas foram capazes de produzir algumas das colônias morfolologicamente associadas ao biofilme. Isso pode ser explicado pelo fato de que esse comportamento é regulado por

condições ambientais, que agem no promotor *agfD* e desencadeia a cascata de produção de biofilme. A habilidade de adaptação a diferentes *habitats* assegura a sobrevivência em diferentes ambientes. A habilidade de mudar os padrões de expressão das fímbrias pode mudar de acordo com a temperatura (Romling et al, 1998). De acordo com Gerstel e Romling (2003), vários fatores podem interferir na formação de biofilme por *Salmonella*, como variações nos níveis de oxigênio e pH, que agiriam diretamente na expressão dessas morfologias.

Comparando os resultados observados, na temperatura de 28°C, Solano et al. (2002) observaram resultados mais elevados, de 93%, quanto à produção da morfologia *rdar*, em comparação com 55,2% do presente trabalho. White et al. (2006), também observaram maior quantidade de cepas produtoras, que ocorreu em 80,5% do total.

A 28°C, segundo Solano et al. (2002), a morfologia *bdar* foi encontrada em 7% dos isolados, valor um pouco menor do que o observado nesse trabalho, de 12,1%. Porcentagem maior foi relatada por Vestby et al. (2009), de 26%. Em relação à morfologia *saw*, Solano et al. (2002) encontraram 27,5% das cepas produzindo esse tipo, valor muito superior aos nossos, de 1,7%, enquanto Vestby et al. (2009) não observaram esse tipo morfológico. Igualmente a Solano et al. (2002) e Vestby et al. (2009), este estudo não observou a morfologia *pdar*. Esse resultado era esperado porque a mudança de cor de vermelho para rosa, implica na deleção do gene *agf*, que foi encontrado em todas as amostras pesquisadas.

Romling et al. (2003) observaram que algumas cepas não produziram biofilme a 37°C. Segundo Kader et al (2006), *S. Typhimurium* UMR1, pode expressar essa matriz ou não, dependendo das condições. O presente estudo demonstrou que ocorreu a produção de biofilme a 35°C (36,2%), embora em quantidade bem menor de cepas, quando comparada a temperatura de 28°C (69%).

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que os genes pesquisados, relacionados com a produção de biofilme, são muito freqüentes em cepas de *Salmonella*. O quadro se agrava pela observação da produção de biofilme por todas as cepas, em pelo menos uma das condições testadas, inclusive em baixas temperaturas.

III. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Escrever as considerações finais foi tão fácil quanto foi difícil escrever as iniciais. Após uma análise crítica dos trabalhos que foram colocados nesse texto, pude visualizar a evolução dos mesmos ao longo desse período de tempo. Posso dizer que vários trabalhos ficaram surpreendentemente bons, de outros, eu realmente esperava por isso e alguns ficaram aquém das expectativas. Desses, venho tentando melhorar, observando quais foram as deficiências. De qualquer maneira, o que posso dizer de todos é que foram feitos da melhor maneira possível, dentro das nossas possibilidades.

Para o futuro, devo confessar que estou extremadamente motivada com biofilmes. Principalmente, com o envolvimento de *quorum sensing*, que é um sistema de comunicação entre células bacterianas, que afeta a expressão de vários fatores de virulência. Um desses sistemas em *S. aureus* é codificado pelo locus *agr*, que consiste de 4 genes (*agrA*, *agrC*, *agrD*, *agrB*), sendo ativado durante a transição da fase de multiplicação exponencial para a estacionária. (VUONG et al., 2000; JEFFERSON et al., 2004). Quando ativado, esse sistema parece inibir a formação de biofilme, nas células de *S. aureus* (VOUNG et al., 2000; UBEDA et al., 2003).

Além disso, também testaremos a formação de biofilmes em superfícies bióticas como cultura de células do epitélio de glândulas mamárias de bovinos e a proteção dessa estrutura a essas células, frente a antimicrobianos utilizados na terapêutica da mastite, além de destes de adesão e invasão.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERC. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE REFEIÇÕES COLETIVAS - ABERC – História e Mercado, 2005. Disponível em: <<http://www.aberc.com.br>>. Acesso em 10 abril 2012.

ACCO, M.; FERREIRA, F.S.; HENRIQUES, J.A.P.; TONDO, E.C. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiology**, v. 20, p. 489-493, 2003.

ADESIYUN, A.A.; WEBB, L.A.; ROMAIN, H.T. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and a composite milk and cattle handlers. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 629–632, 1998.

AGUILERA, M.O.; STAGNITTA, P.V.; MICALIZZI, B.; GUZMÁN, A.M.S. Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* from spices in Argentina. **Anaerobe**, v. 11, p. 327-334, 2005.

AKINEDEN, O.; ANNEMULLER, C.; HASSAN, A. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 959-964, 2001.

AL-BUSTAN, M.A., UDO, E.E.; CHUNG, T.D. Nasal carriage of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* among restaurant workers in Kuwait city. **Epidemiology and Infection**, v. 116, p. 319-322, 1996.

ALMEIDA FILHO, E.S.; SAMPAIO, S.C.O.; BORGES, N.F.; DELMONDES, E.C.; OZAKI, A.S.; SOUZA, L.C. Pesquisa de *Salmonella* spp em carcaças de frango (*Gallus gallus*), comercializadas em feira livre ou em supermercado no município de Cuiabá, MT, Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 110, p. 74- 79, 2003

ANDERSON, J.B.; SHUSTER, T.A.; HANSEN, K.E.; LEVY, A.S.; VOLK, A. A camera's view of consumer food-handling behaviors. **Journal of the American Dietetic Association**, v.104, n.2, p.186-191, 2004.

ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILLIKER, J. *Salmonella* In: DOWNES F. P; ITO, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: APHA, 2001. p. 357-380.

ANGELILLO, I.F.; VIGGIANI, N.M.A.; RIZZO, L. et al. Food handlers and foodborne diseases: knowledge attitudes and reported behavior in Italy. **J. Food Protection**, v. 3, p. 381-385, 2000.

ANRIANY, Y.A.; WEINER, R.M.; JOHNSON, J.A.; REZENDE, C.E.; JOSEPH, S.W. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 displays a rugose phenotype. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p.4048- 4056, 2001.

APEL, D.; WHITE, A.P.; GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B.; SURETTE, M.G. Long-term survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals an infectious state that is underrepresented on laboratory media containing bile salts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.4923- 4925, 2009.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; KONTA, E.M.; SUZUKI, K.; SILVA, M.G.; FERNANDES JÚNIOR, A.; RALL, R.; RALL, V.L.M. Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. **Food Control**, v. 18, n.6, p. 630-634, 2007.

ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2151–2156, 2001.

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica de leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.

ARNOLD, T.; SCHOLZ, H.C.; MARG, H.; ROSLER, U.; HENSEL, A. Impact of *invA*-PCR and culture detection methods on occurrence and survival of

Salmonella in the flesh, internal organs and lymphoid tissues of experimentally infected pigs. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, p. 459- 463, 2004.

ARNOLD, J.W.; YATES, I.E. Interventions for control of *Salmonella*: clearance of microbial growth from rubber picker fingers. **Poultry Science**, v. 88, n. 6, p. 1292- 8, 2009.

ARNON, S.S.; MIDURA, T.F.; DAMUS, K.; THOMPSON, B.; WOOD, R.M.; CHIN, J. Honey and other environmental risk factors for infant botulism. **The Journal of Pediatrics**, v. 94, n. 2, p. 331 – 6, 1979.

ARNON, S.S. Infant botulism. In FEIGEN, R.D.; GERRY, J.D. **Textbook of pediatric infectious diseases**, 3rd ed. Philadelphia 1992, p. 1095–1102.

ARORA, D.J.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, p. 257-262, 1999.

ARROYO G.; ARROYO, J.A. Efficiency of different enrichment and isolation procedures for the detection of *Salmonella* serotypes in edible offal. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, p. 360-7, 1995.

ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**, v. 130, p. 33–40.2003.

ASSÉRE, A.; OULAH, N.; CARPENTIER, B. Comparative evaluation of methods for counting surviving biofilm cells adhering to a polyvinyl chloride surface exposed to chlorine or drying. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1682- 1702, 2008.

ATANASSOVA, V.; MEINDL, A.; RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham- a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, n. 68, p. 105-113, 2005.

AURELI, P.; FRANCIOSA, G.; FENICIA, L. Infant botulism and honey in Europe: a commentary. **Pediatrics and Infectious Disease Journal**, v. 21, p.866–868, 2002.

AYÇIÇEK, H.; AYDOGAN, H.; KÜÇÜKKARAASLAN, A. et al. Assessment of the bacterial contamination on hand of hospital food handlers. **Food Control**, v.15, p. 253-259, 2004.

AYYILDIZ, A.; DEMIR, Y.; GURAKSIN, A.; BABACAN, M. (1990) Apud AYÇIÇEK, H.; AYDOGAN, H.; KÜÇÜKKARAASLAN, A. et al. Assessment of the bacterial contamination on hand of hospital food handlers. **Food Control**, v.15, p. 253-259, 2004.

BABA, T.; TAKEUCHI, F.; KURODA, M.; YAZAWA, H.; AOKI, K.; OGUCHI, Y.; NAGAI, Y.; IWAMA, N.; ASANO, K.; NAIMI, T.; KURODA, H.; CUI, L.; YAMAMOTO, K. ; HIRAMATSU, K.; Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. **Lancet**, v. 359, p. 1819- 1827, 2002.

BAGAMBOULA, C.F.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 4, p. 668 – 673, 2003.

BAILEY, J.S.; CHIU, J.Y.; COX, N.A.; JOHNSTON, R.A. Improved selective procedure for detection of *Salmonella* from poultry and sausage products. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 5, p. 391- 6, 1998.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Analytical chromatography for recovery of small amounts of staphylococcal enterotoxins from food. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 64, p. 33-40, 2001.

BAM. Bacteriological Analytical Manual. Disponível em <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070879.htm>>. Acesso em 10 abril 2012.

BANERJEE, M.; SARKAR, P.K. Microbiological quality of some retail spices in India. **Food Research International**, v. 36, p. 469-474, 2003.

BANIA, J.; DABROWSKA, A.; BYSTRON, J.; KORZEKWA, K.; CHRZANOWSKA, J.; MOLEND, J. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 36 – 41, 2005.

BANNERMAN, T.L.; MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. Manual of clinical microbiology. Washington: **American Society of Microbiology**; p.384-404, 2003

BARASH, J.R.; ARNON, S.S. Dual toxin-producing strain of *Clostridium botulinum* type Bf isolated from a California patient with infant botulism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1713–1715, 2004.

BARASH, J.R.; TAND, T.W.; ARNON, S.S. First case of infant botulism caused by *Clostridium baratii* type F in California. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 4280–4282, 2005.

BAS, M.; ERSUN, A.S.; KIVANÇ, G. The evaluation of food hygiene knowledge, and practices of food handlers in food businesses in Turkey. **Food Control**, **17**: 317-322, 2006.

BASELGA, R., ALBIZU, I., DE LA CRUZ, M., DEL CACHO, E., BARBERAN, M., AMORENA, B. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 4857-.4862, 1993.

BAÚ, A.C.; CARVALHO, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Prevalência de *Salmonella* em Produtos de Frangos e Ovos de Galinha Comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.31, n. 2, p. 303-307, 2001.

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

BEAN, N.H.; GRIFFIN, P.M.; GOULDING, J.S.; IVEY, C.B. Foodborne disease outbreaks, 5-year summary, 1983-1987. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 711-28, 1990.

BEENKEN, K.E.; BLEVINS, J.S.; SMELTZER, M.S. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 4206- 4211, 2003.

BENNET, A.R.; GREENWOOD, D.; TENNANT, C.; BANKS, J.G.; BETTS, R.P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. **Letters of Applied Microbiology**, v. 26, p. 437- 441, 1998.

BERGDOLL, M.S.; ROBBINS, R.N. Characterization of types staphylococcal enterotoxins. **Journal of Milk Food Technology**, v. 36, p. 610- 612, 1973.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*, p. 464-523. In: DOYLE, M.P. **Bacterial foodborne pathogens**. New York, 1989.

BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food. Microbiology**, v. 10, p. 91-100, 1990.

BERGEY'S. **Manual of Determinative Bacteriology**. New York: Ed. Williams & Wilkins, 1986.

BETLEY, M.J.; BORST, D.W.; REGASSA, L.B. *Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology*. **Chemical and Immunology**, v. 55, p.1-35, 1992.

BINNECK, E. As ômicas: integrando a bioinformação. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* (serial online). 2004; 32: 28-37. Disponível em <www.biotecnologia.com.br/revista/bio32/omicas32.pdf>. Acesso 12 set 2011.

BLIVET, D.; SALVAT, G.; HUMBERT, F.; COLIN, P. Evaluation of a new enrichment broth for the isolation of *Salmonella* spp from poultry products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p. 211- 6, 1997.

BOARI, C.A.; MARQUES, S.C.; NASCIMENTO, A.R. et al. Avaliação microbiológica de tortas doces comercializadas no município de Lavras – MG. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2001, Foz do Iguaçu, PR.

BOER, E. Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 43-53, 1998.

BOEREMA, J.A.; CLEMENS, R.; BRIGHWELL, G. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human, and foods isolates of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 192-201, 2006.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO PAULISTA (Bepa) 2004. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa8_salmo9903.htm>. Acesso 20 março 2012.

BORST, D.W.; BETLEY, M.J. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression correlate with *sea* allele class. **Infection and Immunology**, v. 62, p. 113- 118, 1994.

BOULANGE-PETERSON, L. Process of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. **Biofouling**, v. 10, p. 275-300, 1996.

BOWER, C.K.; MC GUIRE, J.; DAESCHEL, M.A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science and Technology**, v.7, p.152-157, 1996.

BOYNUKARA, B.; GULHAN, T.; ALISARLI, M.; GURTURK, K.; SOLMAZ, H. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 209-211, 2008.

BRADLEY, A.J.; LEACH, K.A.; BREEN, J.E.; GREEN, L.E.; GREEN, M.J. Survey of the incidence 233 and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. **Veterinary Record**, v. 160, p. 253- 234 258, 2007.

BRAMLEY, A.J. Mastitis. In: ANDREWS, A.H.; BLOWEY, R.W.; BOYD, H.; Eddy, R.G. (Eds.), **Bovine Medicine: diseases and husbandry of cattle**. Blackwell Scientific Publication, Boston, 1992, p. 289–300.

BRANDA, S.S.; VIK, S.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Bio- films: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**, v. 13, p. 20- 26, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Portaria nº 367, de 4 de setembro de 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Anexo I: Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-sanitária de Carne de Aves. Portaria Nº 210, de 10 de novembro de 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos, 2001a.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Instrução Normativa Nº 3, de 19 de janeiro de 2001 Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, 2001b.

BRETT, M.M.; McLAUCHLIN, J.; HARRIS, A.; O'BRIEN, O.; BLACK, N.; FORSYTH, R.J.; ROBERTS, D.; BOLTON, F.J. A case of infant botulism with a possible link to infant formula milk powder: evidence for the presence of more than one strain of *Clostridium botulinum* in clinical specimens and food. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 769–776, 2005.

BRYAN, F.L. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. **Journal of Food Protection**, v. 43, p. 140-50, 1980.

BURSE, M. Media for *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 117:31, 1995.

CAIAZZA, N.C.; O'TOOLE, G.A. SadB Is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.4476-4485, 2004.

CARDOSO, R.C.V., CHAVES, J.B.P., ANDRADE, N.J. Avaliação da eficiência de agentes sanificantes para mãos de manipuladores de alimentos em serviço de refeições coletivas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 1994, São Paulo.

CARDOSO, A.L.S.P.; CASTRO, A.G.M.; TESSARI, E.N.C.; BALDASSI, L.; PINHEIRO, E.S. Pesquisa de *Salmonella* spp, coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. **Higiene. Alimentar**, v. 19, n. 128, p. 144- 150, 2005.

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

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R. et al. An outbreak of Staphylococcal Food Poisoning in the Municipality of Passos, MG, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 4, p. 581-586, 2003.

CARMO, I.S.; CUMMINGS, C.; LINARDI, V.R.; DIAS, R.S.; SOUZA, J.M.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; SHUPP, J.W.; PEREIRA, R.K.P.; JETT, M. A Case Study of a Massive Staphylococcal Food Poisoning Incident. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 1, n. 4, p. 241-246, 2004.

CARVALHO, A.C.F.B.; CORTEZ, A.L.L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1465-1468, 2005.

CASTAGNA, S.M.F.; MULLER, M.; MACAGNAN, M.; RODENBUSCHE, C.R.; CANAL, C.W.; CARDOSO, M. Detection of *Salmonella* sp. from porcine origin: a comparison between a PCR method and standard microbiological techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 36, p. 373 – 377, 2005.

CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Findings CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States in 2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/PDFs/FACTSHEET_A_FINDINGS_updated4-13.pdf>. Acesso em: 09 abril 2012.

CHEN, T.R.; CHIOU, C.S.; TSEN, H.Y. Use of a 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**, v. 92, p. 189-197, 2004.

CHIANG, Y.C.; CHANG, L.T.; LIN, C.W.; YANG, C.Y., TSEN; H.Y. PCR primers for the detection of staphylococcal enterotoxins K, L, and M and survey of staphylococcal enterotoxin types in *Staphylococcus aureus* isolates from food poisoning cases in Taiwan. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 1072–1079, 2006.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on rubber. **LWT**, v.39, p.11-19, 2006.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; BISNO, A.L.; BEACHEY, E.H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, v. 37, p. 318- 26, 1982.

CHYE, F.Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M. K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**, v, 21, n. 5, p. 535–541, 2004.

CIFTCI, A.; FINDIK, A.; ONUK, E.E.; SAVASAN, S. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 254-261, 2009.

CLUTTERBUCK, A.L.; WOODS, E.J.; KNOTTENBELT, D.C.; CLEGG, P.D.; COCHRANE, C.A.; PERCIVAL, S.L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 121, p.1–17, 2007.

COLLINSON, S.K.; CLOUTHIER, S.C.; DORAN, J.L.; BANSER, P.A.; KAY, W.W. *Salmonella enteritidis agfBAC* operon encoding thin, aggregative fimbriae. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 662– 667, 1996.

CORPE, W.A. Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces. In: Adsorption of microorganisms to surfaces. G. Bitton and K.C. Marshal (Eds), **John Wiley & Sons**, Inc, New York, USA, pp.105-144, 1980.

CORTEZ, A.L.L. **Indicadores de qualidade higiênico-sanitária em lingüiça frescal comercializada no Município de Jaboticabal-SP**. 2003. 42p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2003.

COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v.41, p.435–64, 1987.

COUCH, J.L.; BETLEY, M.J. Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 4507-4510, 1989.

CRAMTON, S.E.; GERKE, C.; SCHNELL, N.F.; NICHOLS, W.W.; GOTZ, F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is presente in *Syaphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, v.67, p.5427-5433, 1990.

CRASS, B.A.; BERGDOLL, M.S. Involvement of coagulase negative staphylococci in Toxic Shock Syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, p. 43- 45, 1986.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; AGNELLINI, D.; CARAMENTI, G.; MORONI, P.; CASTIGLIONI, B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 299-305, 2005.

CRISLEY, F. D; FOTER, M. J. The use of antimicrobial soaps and detergents for hand washing in foodservice establishments. **Journal of Milk and Food Technology.**, v. 28, p. 278-84, 1965.

CUCARELLA, C.; COLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, P. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 2888–2896, 2001.

CUCARELLA, C.; TORMO, M.A.; KNECHT, E.; AMORENA, B.; LASA, I.; FOSTER, T.J.; PENADES, J.R. Expression of biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3180–3186, 2002.

CUCARRELA, C.; TORMO, M. A.; UBEDA, C.; TROTONDA, M. P.; MONZÓN, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, JR. Role of film-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection Immunity**, v. 72, p. 2177-2185, 2004.

DANIELSON, M.L.; HELLBERG, B. The biochemical activity of enterotoxic and non enterotoxic producing staphylococci. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 18, p 266-273, 1977.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 847- 867, 2000.

DE FREITAS, M.A.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Revista de Microbiologia**, v. 21, p. 315-319, 1990.

De WITT, J.C.; KAMPELMACHER, E.H. Some aspects of bacterial contamination of hands of workers in food service establishment. **Zentralblatt fur Bak., Mikro. And Hyg**, 186: 45-54, 1988.

DENIS, M.; REFRÉGIER-PETTON, J.; LAISNEY, M.J.; ERMEL G.; SALVAT, G. *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers, use of a PCR assay for detection and identification of

Campylobacter jejuni and *Campylobacter coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 255 – 267, 2001.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p.881- 890, 2002.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167-193, 2002.

DOSTI, B.; GUZEL-SEYDIM, Z.; e GREENE, A. K. Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, p.19–24, 2005.

DOWNES F. P; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington:APHA, 2001.

DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH – Coleção Alemã de Micro-organismos e Cultura de Células). Disponível em <http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=Staphylococcus&show_all_details=1>. Acesso em: 27 março 2012.

DUNNE, W.M. Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155- 166, 2002.

EKPERIGIN, H.E.; NAGARAJA, K.V. *Salmonella*. **Veterinary Clinical of North America**, v. 14, n. 1, p. 17- 29, 1998.

EL-GAZZAR, F.F.; MARTH, E.H. *Salmonella*, salmonellosis and dairy foods: a review. **Journal of Dairy Science**, v.75, p. 2327- 43, 1992.

EL-SHAREF, N; GHENGESH, K.S.; ABOGNAH, Y.S. Bacteriological quality of ice cream in Tripoli—Libya. **Food Control**, v. 17, p. 637- 641, 2006.

ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; FUSCO, V. et al. PCR – based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 6, p. 1090- 1096, 2004.

EUZÉBY, J. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. Validation list n° 132. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, p.469-472, 2010. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em 26 março 2012.

FATHALLA, W.M.; MOHAMMED, K.A.; AHMED, E.A. Infant botulism type Ba: First culture-confirmed case in the United Arab Emirates. **Pediatric Neurology**, v. 29, n. 3, p. 204-206, 2008.

FDA. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>>. Acesso em: 10 de março de 2012.

FERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ, L. Tipos de toxinas de *S. aureus* en cepas aisladas de alimentos implicados en ETA. Chile 1979–1995. In: PROCEEDINGS OF IV CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS, 1996, Lima, Peru.

FERNÁNDEZ, R.A.; CICARELLI, A.S.; CENTORBI, O.N.P.; CENTORBI, H.; ROSETTI, F.A.; JONG, L.I.T.; DEMO, N. Infant Botulism in Argentina, 1982 – 1997. **Anaerobe**, n. 5, p. 177 - 9, 1999.

FERNANDEZ, M.M.; MARZI, M.C., BERGUER, P.; BURYZN, D.; LANGLEY, R.J.; PIAZZON, I.; MARIUZZA, R.A.; MALCHIODI, E.L. Binding of natural variants of staphylococcal superantigens SEG and SEI to TCR and MHC class II molecule. **Molecular Immunology**, v. 43, p. 927, 938, 2006.

FOX, L.K.; ZADOKS, R.N.; GASKINS, C.T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. **Veterinary Microbiology**, v.107, p.295–299, 2005.

FRANCIOSA, G.; FENICIA, L.; POURSHABAN, M.; AURELI, P. Recovery of a strain of *Clostridium botulinum* producing both neurotoxin A and neurotoxin B from canned macrobiotic food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p.1148- 1150, 1997.

FRANCO, B.D.G.M.; BERGAMO, N.T. Análise microbiológica de misturas prontas destinadas ao tempero de alimentos (“tempero pronto”). **Revista de Microbiologia**, v. 20, n. 3, p. 272-277, 1989.

FRENZEN, P.D. Deaths due to unknown foodborne agents. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.9, p.1536-1543, 2004.

FUERST, R. Microbiology in health and disease: food as vectors of microbial disease. IN: **Sanitation Food Handling**. W. B. Saunders Company, 1983. p. 418-433.

FUEYO, J.M.; MARTIN, M.C.; GONZALEZ-HEVIA, M.A. et al. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 139-145, 2001.

FUEYO, J.M.; MENDONZA, M.C.; MARTIN, M.C. Enterotoxins and toxic shock síndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 187- 194, 2005.

GAILLOT, O.; CAMILLO, D.; BERCHE, P.; COURCOL, R.; SVAGE, C. Comparison of CHROMagar *Salmonella* medium and Hektoen Enteric Agar for isolation of *Salmonella* from stool sample. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 762-5, 1999.

GARCÍA, S.; IRACHETA, F.; GALVÁN, F.; HEREDIA, N. Microbiological survey of retail herbs and spices from Mexican markets. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 1, p. 99-103, 2001.

GARRICK, R.G.; SMITH, A. Evaluation of Rambach agar for the differentiation of *Salmonella* species from other Enterobacteriaceae. **Letters in Applied Microbiology**, v. 18, p. 187-9, 1994.

GAST, R.K. Paratyphoid infections, 11 ed. In: SAIF, Y.M. **Diseases of Poultry**. Ames, Iowa: Iowa State Press, 2003, p.583-613.

GERKE, C.; KRAFT, A.; SUSSMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GOTZ, F. Characterization of the *N-acetylglucosaminyltransferase* activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion. **Journal of Biology and Chemichal**, v. 273, p. 18586-93, 1998.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Importância e risco das especiarias. **Revista Higiene Alimentar**, n. 12, n. 57, p. 23-31, 1998.

GERSTEL, U.; ROMLING, U. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella* Typhimurium. **Environmental Microbiology**, v. 3: p. 638- 648, 2001.

GERSTEL, U.; ROMLING, U. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 10, p. 659- 667, 2003.

GIBSON, D.L.; WHITE, A.P.; RAJOTTE, C.M.; KAY, W.W. *AgfC* and *AgfE* facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. **Society for General Microbiology**, v.153, p.1131-1140, 2007.

GIBSON, H.; TAYLOR, J.H.; HALL, K.E.; HOLAH, J.T. Biofilms and their detection in the food industry. Chipping Campden, UK: **Campden and Chorleywood Food Research Association**, 1995.

GONÇALVES, P.M.R.; FRANCO, R.M.; ZAMBORLINI, L.C. Enumeração de enterococos e coliformes fecais, pesquisa de *Salmonella* e indicação presuntiva de *Proteus*, em cortes e miúdos de frango congelados. **Higiene Alimentar**, v. 12, p. 42- 47, 1998

GRANTCHAROVA, N.; PETERS, V.; MONTEIRO, C.; ZAKIKHANY, K.; ROMLING, U. Bistable Expression of *CsgD* in Biofilm Development of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 2, p. 456- 466, 2010.

GUINEY, D.G. Regulation of bacterial virulence gene expression by the host environment. **Journal of Clinical Investigation**, v.99, p.565–569, 1997.

GÜNDOĞAN, N.; CITAK, S.; TURAN, E. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurised milk and ice cream samples. **Food Control**, v. 17, p. 389- 392, 2006.

HALPIN-DOHNALEK, M.I.; MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus*: production extracellular compounds and behavior in foods – a review. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 267-82, 1989.

HAMILTON, S.; BONGAERTS, R.J.; MULHOLLAND, F.; COCHRANE, B.; PORTER, J.; LUCCHINI, S.; LAPPIN-SCOTT, H.M. ; HINTON, J.C. The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. **Biomed Central Genomics**, v. 10, p. 599, 2009.

HAMMACK, T.S.; AMAGUANA, R.M; JUNE, G.A.; SHERROD, P.S.; ANDREWS, W.H. Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth and Rappaport-Vassiliadis medium for recovery of *Salmonella* spp from foods with a low microbial load. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 1, p. 16-21, 1999.

HANASHIRO, A.; MORITA, M.; PAULA, T.S. Microbiological quality of popular street food in São Paulo city, Brazil. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2001, Foz do Iguaçu, PR.

HARBRON, R.S.; KENT, C.A. Aspects of cell adhesion. In: MELO, L.F.; BOTT, T.R.; BERNARDO, C.A., **NATO ASI Series**, v.145, 1988,. p. 125–140.

HARRAGHY, N.; SEILER, S.; JACOBS, K.; HANNIG, M.; MENGER, M.D.; HERRMANN, M. Advances in in vitro and in vivo models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. **International Journal of Artificial Organ**, v. 29, p.368–378, 2006.

HARVEY, J; GILMOUR, A. Isolation and characterization of staphylococci from goats milk produced in Northern Ireland. **Letters in Applied Microbiology**, v. 7, p. 79- 82, 1988.

HARVEY, J.; GILMOUR, A. Isolation and identification of staphylococci from milk powders produced in Northern Ireland. **Journal of Applied Microbiology**, n. 68, p. 433- 438, 1990.

HATAKKA, M.; BJÖRKROTH, K.J.; ASPLUD, K. et al. Genotypes and enterotoxicity of isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. **Journal of Food Protection**, v. 11, p. 1487-1491, 2000.

HATHEWAY, C.L.; McCROSKEY, L.M. Examination of feces and serum for diagnosis of infant botulism in 336 patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 2334–2338, 1987.

HATHEWAY, C.L. Toxigenic clostridia. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, p. 66–98, 1990.

HOE, F.G.H.; RUEGG, P.L. Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcomes. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 227, p. 1461-1468, 2005.

HOFF, J.F.; SANTOS, L.R.; SCHUCH, D.M.T.; OLIVEIRA, S.D.; CÉ, M.C.; PONTES, A.P.; ROCHA, S.L., SILVA, A.B. Recuperação de diferentes sorovars de Salmonella em leite em pó usando diversas associações de meios líquidos e sólidos seletivos. In: XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1997, Rio de Janeiro-RJ.

HOLAH, J.T.; THORPE, R.H. Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials. **Journal of Applied Microbiology**, v. 69, p. 599- 608, 1990.

HOLECKOVA, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M. et al. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agriculture Environmental and Medicine**, v. 9, p. 179-182, 2002.

HOLTFRETER, S.; BROKER, B.M. Staphylococccal superantigens: do they play a role in sepsis? **Archves of Immunology and Theraphy Experimental**, v. 53, p. 13-27, 2005.

HUMBERT, F.; MORVAN, H.; LALANDE, I.; COLIN, P. (1995) apud BLIVET, D.; SALVAT, G.; HUMBERT, F.; COLIN, P. Evaluation of a new enrichment broth for the isolation of *Salmonella* spp from poultry products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p. 211- 6, 1997.

HURRELL, E.; KUCEROVA, E.; LOUGHLIN, M.; CAUBILLA-BARRON, J.; FORSYTHE, S.J. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii* , *Salmonella* serovars and other Enterobacteriaceae. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p.227- 231, 2009.

HWANG, S.Y.; KIM, S.H.; JANG, E.J.; KWON, N.H.; PARK, Y.K.; KOO, H.C.; JUNG, W.K.; KIM, J.M.; PARK, Y.H. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 99–105, 2007.

ICMSF. **Microorganisms in foods 5**. Microbiological specifications of food pathogens. London, Blackel Academic & Professional, 1996, p. 513.

JABLONSKI, L.M.; BAHACH, L.M. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P.; BUCHAT, L.R.; MONTEVILLE, T.J. (Eds). **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. American society of Microbiology Press, Washington, DC, 1997, p. 353- 357.

JARRAUD, S.; COSON, G.; BES, M.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; LINA, G. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.2446-2449, 1999.

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

JASS, J., WALKER, J.T. Biofilms and biofouling. In: **Industrial biofouling - detection, prevention and control**. WALKER, J.T.; SURMAN, S.; JASS, J. New York, John Wiley & Sons, 2000.

JEFFERSON, K.K.; PIER, D.B.; GOLDMANN, D.A.; PIER, G.B. The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesion locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 2449- 2456, 2004.

JESSEN, B.; LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.51, p.265–269, 2003.

JOHNS, Jr M.B.; KHAN, S.A. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with a discrete genetic element. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 4033-4039, 1988.

JOHNSON, W.M.; TYLER, S.D.; EWAN, F.E. et al. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 426-430, 1991.

JOHNSON, E.A.; TEPP, W.H.; BRADSHAW, M.; GILBERT, R.J.; COOK, P.E.; McINTOSH, E.D. Characterization of *Clostridium botulinum* strains associated with an infant botulism case in the United Kingdom. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2602- 2607, 2005.

JORGENSEN, F.; BAILEY, R.; WILLINS, S.; HENDERSON, P.; WARCING, D.R.; BOLTON, E.J.; FROST, J.A.; WARD, L.; HUMPHREY, T.J. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on cow, whole chicken in relation to sampling methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, p. 151- 164, 2022.

JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 367- 372, 2001.

JUNE, G.A.; SHERROD, P.S.; HAMMACK, T.S.; AMAGUANA, R.M.; ANDREWS, W.H. Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth and Rappaport-Vassiliadis medium for recovery of *Salmonella* spp from

raw flesh and other highly contaminated food: precollaborative study. **Journal of AOAC International**, 1307-23, 1995.

JUNE, G.A.; SHERROD, P.S.; HAMMACK, T.S.; AMAGUANA, R.M.; ANDREWS, W.H. Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth and Rappaport-Vassiliadis medium for recovery of *Salmonella* spp from raw flesh highly contaminated food and poultry feed: collaborative study. **Journal of AOAC International**, 1307-23, 1996.

KADER, A.; SIMM, R.; GERSTEL, U.; MORR, M.; ROMLING, U. Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v. 60, p. 602- 616, 2006.

KARAHAN, M.; AÇIK, M.N.; ÇETINKAYA, B. Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey. **Foodborne Pathogen and Disease**, v. 6, n. 8, p. 1-7, 2009.

KATSUDA, K.; HATA, E.; KOBAYASHI, H.; KOHMOTO, M.; KAWASHIMA, K.; TSUNEMITSU, H.; EGUCHI, M. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. **Veterinary Microbiology**, v.105, p. 301–305, 2005.

KEET, C.A.; FOX, C.K.; MARGETA, M; MARCO, E.; SHANE, A.L; DEARMOND, S.J.; STROBER, J.B; MILLER, S.P. Infant botulism, type F, presenting at 54 hours of life. **Pediatrics Neurology**, v. 32, p. 193–196, 2005.

KETO-TIMONEN, R.; NEVAS, M.; KORKEALA, H. Efficient DNA fingerprinting of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F by amplified fragment length polymorphism analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1148–1154, 2005.

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

KIM, S.; WEI, C. Molecular characterization of biofilm formation and attachment of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium DT104 on food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 9, p. 1841- 1847, 2009.

KIRMA, N.; FERREIRA, J. L; BAUMSTARK, B.R. Characterization of six type A strains of *Clostridium botulinum* that contain type B toxin gene sequences. **FEMS Microbiology Letters**, v. 231, p.159–164, 2004

KLOOS, W.E; MUSSELWITE, M.S. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 30, p. 381-95, 1975.

KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. *Staphylococcus auricularis* sp. Nov.: an inhabitant of human external ear. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 33, p. 9– 14, 1983.

KLOOS, W.E.; BENNERMAN, T.L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 117-40, 1994.

KOKAN, N.P.; BERGDOLL, M.S. Detection of low enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2675- 2676, 1987.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES F. P; ITO, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: APHA, 2001, p. 69-80.

KURODA, M., et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v. 357, p. 1225–1240, 2001.

KUZMA, K.; MALINOWSKI, E.; LASSA, H.; KLOSSOWSKA, A. Detection of genes for enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Bulletin of the Veterinary Research Institute in Pulawy**, v. 47, p. 419-426, 2003.

KWOK, A.Y.C.; CHOW, A.W. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. **International Evolution in Microbiology**, v. 53, p. 87-92, 2003.

KWON, N.H.; KIM, S.H.; PARK, K.T.; BAE, W.K.; KIM, J. Y.; LIM, J.Y.; AHN, J. S.; LYOO, K.S.; KIM, J. M.; JUNG, W. K.; NOH, K. M.; BAHACH, G. A.; PARK, Y. H.; Application of extended single-raction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 137-145, 2004.

LAMMLER, C.H.; AKINEDEN, O.; ANNEMULLER, C.; WOLTER, W.; ZSCHOCK, M. Molecular analysis of virulence factors of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis. In: SYMPOSIUM ON IMMUNOLOGY OF RUMINANT MAMMARY GLAND, 2000, Stresa.

LAMPS, L.W. Pathology of foodborne infectious disease of the gastrointestinal tract: an update. **Advances in Anatomy and Pathology**, v. 10, n. 6, p. 319-327, 2003.

LAPIDOT, A.; ROMLING, U.; YARON, S. Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 229- 233, 2006

LARSEN, H.D.; HUDA, A.; ERIKSEN, N.H.R.; JENSEN, N.E. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. **Veterinary Microbiology**, n. 76, p.153–162. 2000.

LASA, I.; PENADE, J.R. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 99–107, 2006.

LATASA, C., et al. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enteric* serovar Enteritidis, **Molecular Microbiology**, v. 58, p. 1322- 1339, 2005.

LAWRENCE, J.R.; KORBER, D.R.; HOYLE, B.D.; COSTERTON, J.W.; CALDWELL, D.E. Optical sectioning of microbial biofilms. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.20, p. 6558-6567, 1991.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F. et al. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 38–43, 2003.

LINA, G.; BOHACH, G.A.; NAIR, S.P.; HIRAMATSU, K.; JOUVIN-MARCHE, E.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **Journal of Infectious Disease**, v. 189, p. 2334- 2336, 2004.

LINDSTROM, M.; NEVAS, M.; HIELM, S.; LAHTEENMAKI, L.; PECK, M.W.; KORKEALA, H. Thermal inactivation of nonproteolytic *Clostridium botulinum* type E spores in model fish media and in vacuum-packaged hot-smoked fish products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4029–4035, 2003.

LODISH, H.; BERH, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P. **Biologia Celular e Molecular**. Ed. 5ª Porto Alegre: ArtMed, 2005.

LOWBURY, E.J.L.; LILLY, H.A.; BULL, J.P. Disinfection of hands: removal of transient organisms. **British Medical Journal**, n. 2, p. 230- 233, 1964.

LU, Y.; DONG, H.; CHEN, S.; CHEN, Y.; PENG, D.; LIU, X. Characterization of biofilm formation by *Salmonella enterica* Serovar Pullorum strains. **African Journal of Microbiology Research**, v.5, n. 17, p. 2428 -2437, 2011.

LUCEY, B.; FEURER, C.; GREER, P.; MOLONEY, P.; CRYAN, B.; FANNING, S. Antimicrobial resistance profiling and DNA Amplification Fingerprint (DAF) of thermophilic *Campylobacter* spp. in human, poultry and porcine samples from the Cork region of Ireland. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 727-734, 2000.

LÜTHJE, P.; SCHWARZ, A. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular to macrolide-

lincosamide resistance phenotypes and genotypes. **Journal of Antimicrobiol Chemotherapy.**, v. 57, p. 966-969, 2006.

MAIJALA, R.; JOHANSSON, T.; HIERN, J. Growth of *Salmonella* and competing flora in five commercial Rappaport-Vassiliadis (RV)- Medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 17, p. 1-8, 1992.

MAJTÁNOVÁ, L.; HOSTACKÁ, A.; MAJTÁN, V. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on biological properties of *Salmonella typhimurium*. **Folia Microbiologica**, v. 39, p. 141–146, 1994.

MALCOVA, M.; HRADECKA, H.; KARPISKOVA, R.; RYCHLIK, I. Biofilm formation in Field strains of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium: Identification of a new colony morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 129, p 360- 366, 2008.

MARIN, C.; HERNANDIZ, A.; LAINEZ, M. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. **Poultry Science**, v. 88, p. 424- 431, 2009.

MARR, J.C.; LYON, J.D.; ROBERSON, J.R.; LUPHER, M.; DAVIS, W.C.; BOHACH, G.A. Characterization of novel type C Staphylococcal enterotoxin: biological and evolutionary implications. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 4254- 4262, 1993.

MARTIN, M.C.; FUEYO, J.M.; GONZALEZ-HEVIA, M.A.; MENDOZA, M.C. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 279-286, 2004.

MASELLI, R.A. Pathogenesis of Humam Botulism. **Annals of New York Academy Science**, v. 841, p. 122 - 9, 1998.

MASUD, T.; ALI, A.M.; SHAH, M.A. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy products. **Journal of Food Microbiology**, v. 14, p. 119- 126, 1993.

MATHIEU, A.M.; ISIGIDI, B.K.; DEVRIESE, L.A.; GODARD, C.; VAN HOOFF, R. Characterization of *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp strains isolated from bovine meat in Zaire. **International Journal of Food Microbiology**, v. 14, p. 119- 126, 1991.

MATHUR, T.; SINGHAL, S.; KHAN, S.; UPADHYAY, D.J.; FATMA, T.; RATTAN, A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci an evaluation of three different screening methods. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, p. 25- 29, 2006.

MATUTE, P.; MARTINEZ, J.F. Outbreak of food poisoning due to *Staphylococcus aureus* on the island of Tenerife (Canary Islands, Spain). **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 50, n. 1, S31, 1997.

McKENNEY, D.; HUBNER, J.; MULLER, E.; WANG, Y.; GOLDMANN, D. A.; PIER, G. B. The ica locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesion. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 4711- 4720, 1998.

MELCHIOR, M.B.; FINK-GREMMELS, J.; GAASTRA, W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. **Journal of Veterinary and Medical Bacteriology**, v. 53, p.326–332, 2006.

MELO, C.B.; ALMEIDA, B.M.; OLIVEIRA, A.A.; AZEVEDO, H.C.; MELO, L.S.S.; MATA, S.S. Avaliação de uma metodologia profilática contra a mastite clínica em ovelhas da raça Santa Inês. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 4, p. 1011- 1013, 2008.

MEMPEL, M.; LINA, G.; HOKJA, M.; SCHONOPP, C.; SEIDL, H.P.; SCHAFER, T.; RING, J.; VANDENESCH, F. et al. High prevalence of superantigens associated with the ecg locus in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with atopic eczema. **European Journal of Clinical Microbiology and Infection Disease**, v. 22, p. 306- 309, 2003.

MESSIAS, G.M. **Aspectos higiênico-sanitários, manipuladores de alimentos, gerentes e consumidores: situações das lanchonetes tipo fast**

food da cidade do Rio de Janeiro, RJ. 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Rural do Rio de Janeiro, 2007.

MIDURA, T.F. Update: Infant Botulism. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 119 - 25, 1996.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**, v. 124, p. 66–72, 2007.

MOREIRA, P.L.; LOURENCÃO, T.B.; PINTO, J. P. A. N.; RALL, V.L.M. Microbiological Quality of Spices Marketed in the City of Botucatu, São Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 2, p. 421-424, 2009.

MORETRO, T.; VESTBY, L.K.; NESSE, L.L.; HANNEVIK, S.; KOTLARZ, K.; LANSRUD, S. Evaluation of efficiency of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1005-12, 2009.

MORINGO, M.A.; MARTINEZ, M.E.; MUNOZ, A.; CORMAX, R. Evaluation of different plating medio used im the isolation of salmonellas from enviromnemtal samples. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 353-60, 1989.

MOSSEL, D.A.A.; VAN NETTEN, P. Staphylococcus aureus and related staphylococci in foods: ecology, proliferation, toxigenesis, control and monitoring. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 69, p. 123- 145, 1990.

MOTTA, O.V.; FOLLY, M.M.; SAKYIAMA, C.C.H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 27-31, 2001.

MS. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf>. Acesso em: 10 abril 2012

MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PLoS Pathogens**, v.5, e1000213., 2008.

MUNSON, S.H.; TREMAINE, M.T.; BETLEY, M.J., WELCH, R.A. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 3337- 3348, 1998.

MYINT, M.S.; JOHNSON, Y.J.; TABLANTE, N.L.; HECKERT, R.A. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. **Food Microbiology**, v. 23, p. 599- 604, 2006.

NADER FILHO, A.; ROSSI JR. O.D.; ITURRINO, R.P.S. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em leite de vacas com mastite subclínica. **Reviews of Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 369-373, 1988.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JR, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1316-1318, 2007.

NARQUET, F.; ROUPAS, A. Comparação de Rappaport-Vassiliadis semi sólido (RVSS), Rambach ágar e CHROMagar no isolamento de *Salmonella* em peles de frango. Departamento de Ação Social e de Saúde- Divisão Geral de Saúde Pública, Genebra, 26/07/1996a.

NARQUET, F.; ROUPAS, A. Comparação de Rappaport-Vassiliadis semi sólido (RVSS), Rambach ágar e CHROMagar para a detecção *Salmonella* spp. Departamento de Ação Social e de Saúde- Divisão Geral de Saúde Pública, Genebra, 11/11/1996b.

NASHEV, D.; TOSHKOVA, K.; ISRINA, S.; SALAISA, S.; HASSAN, A.A; LAMMLER, C.; ZSCHOCK, M. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. **FEMS Microbiology Letters**, v. 233, p. 45-52, 2004.

NEVAS, M.; LINDSTROM, M.; HAUTMAKI, K.; PUOSKARI, S.; KORKEALA, H. Prevalence and diversity of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in honey produced in the Nordic countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 145- 151, 2005.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SUCUOTA, S.; BOLZONI, G.; Di GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P.; La SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N.C.; CELANO, G. V. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in foods products marketed in Italy. **Food Microbiology** v. 98, p. 73-79, 2005.

NOTERMANS, B.; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, A. Existing and emerging foodborne disease. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, p. 197-205, 1992.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49–79, 2000.

of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis*

OKOJI, C.N.; INGLIS, B.; STEWART, P.R. Potential problem in the use of oligonucleotide probes for staphylococcal enterotoxin genes. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 74, p. 637- 644, 1993.

OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L.M.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates **Veterinary Microbiology**, v. 118, pp 133–140, 2006.

OLIVEIRA, M.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C; BEXIGA, R.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 124, pp 187–191, 2007.

OMOE, K.; ISHIKAMA, M.; SHIMODA, Y. et al. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin

productivities of *S. aureus* isolate harboring seg, she or sei genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 857-862, 2002.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H. et al. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 6088-6094, 2003.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **Fems Microbiology Letters**. v. 256, p. 191-198, 2005.

ORWIN, P.M.; LEUNG, D.Y.M.; DONAHUE, H.L. et al. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 360-366, 2001.

ORWIN, P.M.; FITZGERALD, J.R.; LEUNG, D.Y.M. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 2916-2919, 2003.

PARK, J.Y.; FOX, L.K.; SEO, K.S.; MCGUIRE, M.A.; PARK, Y.H.; RURANGIRWA, F.R.; SISCHO, W.M.; BOHACH, G.A. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**, v. 147, p.142-148, 2011.

PEACOCK, S.; MOORE, C.; JUSTICE, A.; KANLAZANOU, M.; STOU, L.; MACKIE, K.; O'NEIL, G.; DAY, N. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural population of *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v.70, p. 4987- 96, 2002.

PECK, M. W.; FAIRBAIRN, D.A.; LUND, B.M. Heat-resistance of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* estimated on medium containing lysozyme. **Letters of Applied Microbiology**, v. 16, p.126–131, 1993.

PEDROSO, D.M.M.; RALL, V.L.M.; GAMBA, R.C., HEIDTMANN, S.; IARIA, S.T. Critical Control Points for meat balls and kibbe preparations in a hospital kitchen. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 347-355, 1999.

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J. et al. Staphylococcal food poisoning from cream-filled cake in a metropolitan area of South-Eastern Brazil. **Revista Saúde Pública**, v. 28, n. 6, p. 406-409, 1994.

PINTO, B.; CHENOLL, E.; AZNAR, R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. **Systematic And Applied Microbiology**, v. 28, p. 340-352, 2005.

PIZZOLITTO, E.L. **Contribuição ao estudo *in vitro* da corrosão induzida por microrganismos sobre liga metálica a base de cobre, de uso na Odontologia: modelo experimental com as cepas cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus***. 1997. Tese (Doutorado) – UNESP/ Araraquara, 1997.

POL, M.; RUEGG, P.L. Relationship between antimicrobial usage and antimicrobial susceptibility of Gram-positive mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 262-273, 2007.

POLLLEDO, J.J.F.; GARCIA, M.L.; MORENO, B. Phage typing, enterotoxin production and antibiotic resistance of *S. aureus* strains isolated from food handlers. **Archives Fur Lebensmittelhygiene**, v. 36, n. 4, p. 79-82, 1985.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P.I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Supplement 2003 – 2007 (No. 47) to the White- Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, p.26- 29, 2010.

RADDI, M.S.G.; LEITE, C.Q.F.; MENDONÇA, C.P. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista Saúde Pública**, v. 22, p. 36-40, 1988.

RALL, V.L.M.; BOMBO, A.J.; LOPES, T.F.; CARVALHO, L.R., SILVA, M.G. Honey consumption in the state of São Paulo: a risk to human health? **Anaerobe**, v. 9, p. 299-303, 2003.

RALL, V.L.M.; RALL, R.; ARAGON, L.C., SILVA, M.G. Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 147- 150, 2005.

RALL, V.L.M.; VIEIRA, F.P.; RALL, R; VIEITIS, R.L.; CANDEIAS, J.M.G.; CARDOSO, KFG; ARAÚJO JR., J.P. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. **Veterinary Microbiology**, v.132, p. 408–413, 2008.

RALL, V.L.M.; MARTIN, J.G.P., CANDEIAS, J.M.G.; CARDOSO, K.F.G., SILVA, M.G., RALL, R.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P. Pesquisa de *Salmonella* e das condições sanitárias em frangos e linguiças comercializados na cidade de Botucatu. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 167-174, 2009.

RALL, V.L.M.; SFORCIN, J.M.; DEUS, M.F.; SOUSA, D.C.; CAMARGO, C.H.; GODINHO, N.C.; GALINDO, L.A.; SOARES, T.C.S.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P. PCR detection of enterotoxins genes in coagulase negative staphylococci isolated from Brazilian Minas cheese. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, p. 1121-1123, 2010a.

RALL, V.L.M.; SFORCIN, J.M.; AUGUSTINI, V.C.M.; WATANABE, M.T.; FERNANDES, JR. A.; RALL, R.; SILVA, M.G.; ARAÚJO JR, J.P. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus sp* isolated from nasal cavities and hands of food handlers. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 40, p. 1067- 1073, 2010b.

RALL, V.L.M.; CARDOSO, K.F.G.; CHAVIER, C. Qualidade microbiologica de pescado comercializado na Cidade de Botucatu. **Higiene Alimentar**, v. 25, n. 192/193, p.123-125, 2011.

RAMBACH, A. New plate medium for facilities differentiation of *Salmonella* spp from *Proteus* spp and other enteric bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 301-3, 1990.

RAMESH, N.; Joseph, S.W.; Carr, L.E.; Douglass, L.W.; Wheaton, F.W. Evaluation of chemical disinfectants for the elimination of *Salmonella* biofilms from poultry transport containers. **Poultry Science**, v. 81, p. 904-910, 2002.

REN, K.; BANNAN, J.D; PANCHOLI, V. et al. Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 1675-83, 1994.

RHODES, P.; QUESNEL, L.B. Comparison of Muller-Kauffmann Tetrathionate broth with Rappaport-Vassiliadis (RV) medium for the isolation of salmonelas from sewage sludge. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 60, p. 161-7, 1986.

RIBEIRO, M.T. **Caracterização de *Staphylococcus* isolados de quartos mamários de bovinos inicialmente reagentes a prova do “Califórnia Mastitis Test”**. 1991, 62p. Tese (Mestrado) – Universidade Rural do Rio de Janeiro, 1991.

RICK, J.R.; ASCHER, D.P.; SMITH, R.A. Infantile Botulism: an Atypical Case of an Uncommon Disease. **Pediatrics**, v. 103, n. 5, p. 1038 - 1039, 1999.

RISTORI, C.A.; PEREIRA, M.A.S.; GELLI, D.S. Behavior of *Salmonella* Rubislaw on ground black pepper (*Piper nigrum* L.). **Food Control**, v. 18, p. 268-272, 2007.

ROBBINS, R.; GOULD, S., BERGDOLL, M., Detection the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Applied Microbiology**, v.28, p. 946-50, 1974.

RODRIGUEZ, M.; NUNEZ, F.; CÓRDOBA, J.J.; BERMUDEZ, E.; ASENSIO, M.A. Gram positive catalase-positive cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 62, p. 1897- 1902, 1996.

ROMLING, U.; SIERRALTA, W.D.; ERIKSSON, K.; NORMARK, S. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 249–264, 1998.

ROMLING, U.; ROHDE, M. Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella typhimurium* on the community level. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, p. 91–102, 1999.

ROMLING, U.; ROHDE, M.; OLSEN, A.; NORMARK, S.; REINKOSTER, J. *AgfD*, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. **Molecular Microbiology**, v. 36, p. 10–23, 2000.

ROMLING, U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 205–212, 2002.

ROMLING, U.; BOKRANZ, W.; RABSCH, W.; ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; TSCHAPE, H. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 293, p. 273–285, 2003.

ROSEC, J.P.; GIGAUD, O.; DALET, C.; RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci from foods in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 213-221, 1997.

ROSEC, J.P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 61-70, 2002.

ROSENBERG, M.; KJELLEBERG, S. Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. **Advances in Microbiol Ecology**, v.9, p.353-393, 1986.

SANTOS, C.C.M.; GRACIANO, R.A.S.; PERESI, J.T.M.; RIBEIRO, A.K.; CARVALHO, I.S.; QUIRINO, G.K.; LOPES, M.R.V.; SILVEIRA jr.; B.P. Avaliação dos padrões de identidade e qualidade da pimenta do reino comercializada na região de São José do Rio Preto, SP. **Revista Higiene Alimentar**, n. 13, n. 61, p.101-104, 1999.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Importância e efeito de bactérias psicrotóficas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n.82, p.13-19, 2001.

SAUER, K.; CAMPER, A.K.; EHRLICH, G.D.; COSTERTON, J.W.; DAVIES, D.G. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. **Journal of Bacteriology**, v.184, n.4, p.1140-1154, 2001.

SCHER, K.; ROMLING, U.; YARON, S. Effect of heat, acidification, and chlorination on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells in a biofilm formed at the air–liquid interface. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1163–1168, 2005.

SCHERRER, D.; CORTI, S.; MUEHLHERR, J.E.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 101, p. 101–107, 2004.

SCHLEIFER, K.H.; KLOOS, W.E. Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosus*. **International Journal of Bacteriology**, v. 25, p. 50-61, 1975.

SCHOCKEN – ITURRINO, R.P.; CARNEIRO, M.C.; KATO, E.; SORBARA, J.O.B.; ROSSI, O.D.; GERBASI, L.E.R. Study of the presence of the spore of *Clostridium botulinum* in honey in Brazil. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 24, p. 379 - 82, 1999.

SEENAPPA, M.; KEMPTON, A.G. A note on the occurrence of *Bacillus cereus* and other species of *Bacillus* in Indian spices of export quality. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 50, p. 225-228, 1981.

SHAFER, W.M.; IANDOLO, J.J. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. **Infection and Immunology**, v. 20, p. 273- 278, 1978.

SHALITA, Z.; HERTMAN I.; SAND, S. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin production in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 129, p. 317- 325, 1977.

SHAPIRO, R.L.; HATHEWAY, C.; SWERDLOW, D.L. Botulism in the United States: A Clinical And Epidemiological Review. **Annals of International Medicine**, v. 129, n. 3, p. 221 – 8, 1998.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science and Technology**, p. 1-7, 2009.

SILVA, Jr., E.A.; IARIA, S.T.; ANDRADE, C.R. et al. **Fundamentos para o diagnóstico e prevenção das toxinfecções alimentares na cozinha industrial**. São Paulo: Central de Diagnóstico Laboratoriais, 1990.

SILVA, E.R.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxin A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian daury herds. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 103-107, 2005.

SIMÕES, M.; PEREIRA, M.O.; VIEIRA, M.J. Monitoring the effects of biocide treatment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms formed under different flow regimes. **Water Science and Technology**, v.47, n.5, p.217- 223, 2003.

SIMÕES, M.; SILLANKORVA, S.; PEREIRA, M.O.; AZEREDO, J.; VIEIRA, M.J. The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. **Biofouling**, v. 24, p. 249- 258, 2007.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; CLETO, S.; PEREIRA, M.O.; VIEIRA, M.J. The effects of a biocide and a surfactant on the detachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 335- 341, 2008.

SIMÕES, M.; VIEIRA, M.J. Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide, **Proceedings of the international conference processes in biofilms: Fundamentals to applications**, Davis, CA, USA, 2009, p.58–62.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber, and polytetrafluorethylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, 17:439-447, 2000.

SNOWDON, J.A.; CLIVER, D.O. Microorganisms in honey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31. p. 1 - 26, 1996.

SOLANO, C.; GARCIA, B.; VALLE, J.; BERASAIN, C.; GHIGO, J.M.; GAMAZO, C.; LASA, I. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular Microbiology**, 43:793–808, 2002.

SOTO, A.C.; SALDIAS, M.E.M.; OVIEDO, P.H.; FERNANDEZ, M.C. Prevalencia de *S. aureus* em manipuladores de alimentos de una Universidad de la Región Metropolitana. **Revista Médica do Chile**, n. 124, p. 1142- 1146, 1996.

SOUMET, C.; GWENNOLA, E.; FACH, P.; COLIN, P. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of *Salmonella* from chicken products by polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, p. 294- 298, 1994.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods**, v. 40, p. 175–179, 2000.

STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; MIJAC, M.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**, 20:339-343, 2003.

STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; RANIN, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 428-432, 2004.

STEPHAN, R.; ANNEMULLER, C.; HASSAN, A.A.; LAMMLER, C.H. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 78, p. 373-382, 2001.

STILES, B.G.S.; KRAKAUER, T. Staphylococcal enterotoxins: a purging experience in review, Part I. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 27, n. 23, p. 179- 185, 2005.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 56, p. 187–209, 2002.

STRACHAN, T.; READ, A.P. **Genética Molecular Humana**. Ed. 2ª. Porto Alegre: ArtMed, 2002.

SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. **Journal of Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1438-43, 1995.

SUEN, J.C.; HATHEWAY, C.L.; STEIGERWALT, A.G.; BRENNER, D.J. *Clostridium argentinense*, sp. nov: a genetically homogenous group composed of all strains of *Clostridium botulinum* type G and some nontoxigenic strains previously identified as *Clostridium subterminale* or *Clostridium hastiforme*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p. 375, 1988.

SUTRA, L.; POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, p. 79–89, 1994.

TAPONEN, S.; KOORT, J.; BJÖRKROTH, J.; SALONIEMI, H.; PYÖRÄLÄ, S. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 283, p. 3301-3307, 2007.

TAPONEN, S.; SIMOJOKI, H.; HAVERI, M.; LARSEN, H.D.; PYÖRÄLÄ, S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase negative staphylococci identified with API or AFLP. **Veterinary Microbiology**, v. 115, p. 199- 207, 2006.

TAPONEN, S.; PIESSENS, K.V.; COILLIE, E.V.; VliegHER, S.; KOORT, J.M.K. *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**, n. 62, p. 61- 65, 2012.

TASKANAL, N., 1993 Apud AYÇIÇEK, H; AYDOGAN, H.; KÜÇÜKKARAASLAN, A. et al. Assessment of the bacterial contamination on hand of hospital food handlers. **Food Control**, v.15, p. 253-259, 2004.

TIETJEN, M.; FUNG, D.Y.C. *Salmonella* and food safety. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, p. 53- 83, 1995.

TORMO, M.A.; KNECHT, E.; GOTZ, F.; LASA, I.; PENADES, J.R. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? **Microbiology**, v. 151, p. 2465-2475, 2005.

TORTORA, G.J; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology**. Ed. 10^a. Pearson 2010, p. 960.

TRACHOO, N.; FRANK, J.F.; STERN, N.J. Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1110-1116, 2002.

TRANter, H.S. Foodborne illness: foodborne staphylococcal illness. **Lancet**, v. 336, p. 1044-1046, 1996.

TREMAINE, M.T.; BROCKMAN, D.K.; BETLEY, M.J. Staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). **Infection and Immunity**, v. 61, p. 356- 359, 1993.

TURKI, Y.; OUZARI, H.; MEHRI, I.; AISSA, R.B. ; HASSEN, A. Biofilm formation, virulence gene and multi-drug resistance in *Salmonella* Kentucky isolated in Tunisia. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 940-946, 2012.

UBEDA, C.; TORMO, M. A.; CUCARELLA, C.; TROTONDA, P.; FOSTER, T. J.; LASA, I.; PENADES, J. R. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. **Molecular Microbiology**, v. 49, p. 193–210, 2003.

UDO, E.E.; AL-BUSTAM, M.A.; JACOB, L.E. et al. Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait city may be

a potential cause of food poisoning. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p. 819-823, 1999.

ÚNICA. UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (UNICA). Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em : 27 março 2012.

VALERIANO, C. et al. Avaliação higiênico-sanitária de miúdos de frango comercializados na cidade de Lavras-MG. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104/105, p. 214-215, 2003.

VAN de BUSSCHE, R.A.; LYON, J.D.; BOHACH, G.A. Molecular evaluation of the staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin gene family. **Molecular and Phylogenetic Evolution**, v. 2, p. 281- 292, 1993.

VANDENBERGH, M.F.Q.; YZERMANN, E.P.F.; BELKUM, A.V.; BOELENS, H.A.M.; SIJMONS, M. VERRUGH, H.A. Follow-up of *S. aureus* nasal carriage after years: redefining the persistent carrier state. **Journal of Clinical Microbiology**, **10**, 3133-3140, 1999.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. Londres, Wolfe, 1991. 550p.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p.179–185, 2003.

VAUTOR, E.; CARSENTI-DELLAMONICA, H.; SABAH, M.; MANCINI, G; PEPIN, M; DELLAMONICA, P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms (*agr* group, adherence, slime, resistance to antibiotics). **Small Ruminant Research**, v 72, p. 197–199, 2007.

VERAS, J.F.; CARMO, L.S.; TONG, L.C.; SHUPP, J.W.; CUMMINGS, C.; SANTOS, D.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CANTINI, A.; NICOLI, J.R.; JETT, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase negative and coagulase positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais Brazil. **Journal of Infectious Disease**, n. 12, p. 410- 415, 2008.

VERNOZY- ROZAND, C.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci isolated from goat's milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 271-280, 1996.

VESTBY, L.K.; MORETRO, T.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; NESSE, L.L. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal-and feed factories. **BMC Veterinary Research**. V. 5, p. 1-6, 2009.

VON EIFF, C.; BECKER, K.; MACHKA, K.; STAMMER, H.; PETERS, G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. **New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 11-6, 2001.

VUONG, C.; SAENZ, H.L.; GOTZ, F.; OTTO, M. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. **J. Inf. Disease**, v.182, p.1688–1693, 2000.

WANG, S.C.; WU, C.M.; XIA, S.C.; QI, Y.H.; XIA, L.N.; SHEN, J.Z. Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 276-281, 2009.

WARKE, R.; KAMAT, A.; KAMAT, M.; THOMAS, P. Incidence of pathogenic psychrotrophs in ice cream sold in some retail outlets in Mumbai, India. **Food Control**, v. 11, p. 77- 83, 2000.

WHITE, A.P.; SURETTE, M.G. Comparative genetics of the rdar morphotype in *Salmonella*. **Journal of Bacteriology**, v.188, n.24, p.8395–8406, 2006.

WHITE, A.P.; WELJIE, A.M.; APEL, D.; ZHANG, P.; SHAYKHUTDINOV, R.; VOGEL, H.J. A global metabolic shift is linked to *Salmonella* multicellular development. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p11814, 2010.

WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threp_fr.htm. Acesso em 10 março 2009.

WIENEKE, A.A.; ROBERTS, D.; GILBERT, R.J. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969–1990. **Epidemiology and Infection**, v. 110, p. 519–531, 1993.

WONG, A.C. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 10, p. 2765- 2770, 1998.

ZAKIKHANY, K.; HARRINGTON, C.R.; NIMTZ, M.; HINTON, J.C.; ROMLING, U. Unphosphorylated *CsgD* controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 771–786, 2010.

ZAR, JH. **Biostatistical analysis**. Prentice Hall, New Jersey, 1996, 718p.

ZECCONI, A.; CESARIS, L.; LIANDRIS, E.; DAPRA, V.; PICCININI, R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. **Microbiology Pathogens**, v. 40, p. 177–183. 2006.

ZELL, C.; RESCH, M.; ROSENSTEIN, R.; ALBRECHT, T.; HERTEL, C.; GÖTZ, F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, p. 246– 251, 2008.

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

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 125-148, 1994.

ZSCHOCK, M.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; HAMANN, H.P.; LAMMLER, C.H. Pattern of enterotoxin *gene seg, she, sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 108, p. 243-249, 2005.