

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**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**

ADEL MAMPRIM FILHO

BOTUCATU - SP

2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**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**

ADEL MAMPRIM FILHO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

BOTUCATU - SP

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Mamprim Filho, Adel.

Enterotoxinas de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa isoladas das fossas nasais e mãos de manipuladores de alimentos / Adel Mamprim Filho. – 2006.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

Orientador: Vera Lúcia Mores Rall

Assunto CAPES: 50701061

1. Bacteriologia 2. Intoxicação alimentar 3. Alimentos - Manipulação
4. Higiene alimentar

CDD 615.954

Palavras-chave: Enterotoxinas; PCR; *Staphylococcus*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

À minha orientadora Dra. Vera Lúcia Mores Rall, pelo apoio, paciência e participação constante em todas as etapas deste estudo.

Aos professores do Departamento de Inspeção de alimentos da FMVZ – UNESP – Botucatu, José Paes de Almeida Pinto, Germano Francisco Biondi e seus pós-graduandos e residentes que apoiaram a realização deste trabalho.

Aos professores do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, João Pessoa Araújo Junior e João Candeias e seus pós-graduandos pela colaboração em diversas etapas do experimento.

À professora Dra. Maria Jaqueline Mamprim e seu marido, Paulo, pelo apoio com que sempre fui recebido.

Aos estagiários e funcionários do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, pela colaboração no processamento das coletas.

Às Bibliotecárias Selma e Rosemeire pela orientação de catalogação e edição para confecção da dissertação.

Aos funcionários da seção de pós-graduação da FMVZ – UNESP.

Ao apoio financeiro ao projeto FAPESP (0555706-9).

RESUMO

MAMPRIM FILHO, A. **Enterotoxinas de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa isoladas das fossas nasais e mãos de manipuladores de alimentos.** Botucatu. 2006. 62p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – Botucatu.

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. As fossas nasais têm sido relatadas como a fonte mais importante de disseminação de *Staphylococcus* enterotoxigênico, seguido pelas mãos dos manipuladores. Nesse trabalho pesquisou-se a presença de estafilococos coagulase negativa e 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%). A prevalência dos isolados 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*. Os genes das enterotoxinas estafilocócicas A, B, C, D, E, G, H, I e J foram pesquisados pela PCR e entre as 20 cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, 19 (95%) foram positivas para um ou mais genes que codificam para as diversas enterotoxinas pesquisadas. O número de ECN produtores de enterotoxinas foi alto, de 46,8% (29 cepas positivas). Considerando-se 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. A pesquisa das novas SES aumentou consideravelmente a porcentagem de cepas enterotoxigênicas dos dois grupos, aumentando assim, o potencial patogênico desse grupo de bactérias. O papel dos

ECN deve ser revisto e sua importância, reconhecida, pois, sempre foram considerados contaminantes de alimentos, sem despertar a atenção.

ABSTRACT

MAMPRIM FILHO, A. **Enterotoxins of positive and negative coagulase *Staphylococcus* isolated from nasal and hand of food handlers.** Botucatu. 2006. 62p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – Botucatu.

The food handlers are important parts in the quality of foods, being able to cause foodborne disease, by the introduction of pathogens during the processing, distribution and manipulation of foods. Nasal cavities are the most important source of dissemination of enterotoxigenic *Staphylococcus*, followed by hands. The aim of this study was search negative and positive coagulase *Staphylococcus* in 82 food handlers distributed among three different industrial kitchens, analyzing nasal and hands swabs, with isolation and identification of 62 coagulase-negative (75,6%) and 20 coagulase-positive strains (24,4%). The prevalence was of 20 isolated (24,4%) for *S. aureus*, 37 (45,1%) for *S. warneri*, 23 (28%) for *S. epidermidis* and 1 (1,2%) for *S. xylosus* and *S. capitis*. Staphylococcal enterotoxins genes (A, B, C, D, E, G, H, I e J) had been searched by PCR. In 20 positive coagulase *Staphylococcus*, 19 (95%) were positive for one or more genes. The number enterotoxigenic ECN was high (46,8%). Considering all enterotoxins, independent of the species of *Staphylococcus*, the more common was SEA (35,4%), followed for SEH and SEJ, both with 14 strains (29,2%), SEG, being produced by 13 isolates (27,1%), SEI (22,9%) and SEE, SEB and SEC, for 7 (14,6%), 6 (12,5%) and 5 strains (10,4%), respectively. The SED was not observed. The detection of new SES increased the number of enterotoxigenic isolates in both groups, with the growing of pathogenic potential in this genus. The paper of ECN should be reviewed and its importance, recognized, because, had been always considered as contaminants of foods, without pay attention.

LISTA DE QUADROS	Página
Quadro 01. Oligonucleotídeos e seus propriedades utilizados na detecção de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva ou negativa, produtores de toxinas A, B, C, D, E, G, H e I, J.....	31

LISTA DE TABELAS	Página
Tabela 01. Presença de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa ou positiva, isolados a partir de fossas nasais e/ou mãos de manipuladores em 3 cozinhas industriais.....	35
Tabela 02. Perfil de contaminação dos manipuladores, quanto ao local de coleta e espécie de <i>Staphylococcus</i> encontrada.....	36
Tabela 03. Perfil de contaminação dos manipuladores, quanto ao local de coleta e espécie de <i>Staphylococcus</i> encontrada.....	37
Tabela 04. Perfil de contaminação dos manipuladores, quanto ao local de coleta e espécie de <i>Staphylococcus</i> encontrada.....	38
Tabela 5. Presença de genes produtores de toxinas em <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa ou positiva em fossas nasais e mãos de manipuladores de alimentos.....	41

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 1. Frequência e associações entre estafilococos coagulase negativa ou positiva, isolados a partir das mãos e fossas nasais de manipuladores de 3 cozinhas.....	34
Figura 2. Distribuição das espécies de <i>Staphylococcus</i> , isoladas a partir de 82 manipuladores de alimentos, em três cozinhas industriais, na cidade de Botucatu.....	38
Figura 3. Gel de eletroforese do produto da PCR das toxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J de <i>Staphylococcus aureus</i>	40
Figura 4. Distribuições das cepas isoladas de acordo com a presença dos genes produtores das enterotoxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J entre os estafilococos coagulase negativa e positiva.....	43

SUMÁRIO	Página
1. INTRODUÇÃO.....	09
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. Características do Staphylococcus.....	11
2.2. Enterotoxinas estafilocócicas.....	13
2.3. Intoxicações estafilocócicas.....	17
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Coleta do Material para Análise.....	26
4.2. Isolamento e Identificação de Estafilococos.....	27
4.3. Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos.....	28
4.4. Detecção dos Genes Produtores de Enterotoxinas.....	29
4.4.1. Extração e Purificação de DNA.....	29
4.4.2. Amplificação do Ácido Nucléico (PCR).....	30
4.4.3. Visualização dos Produtos Amplificados.....	30
4.5. Estatística.....	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1. ECP e ECN identificados nas fossas nasais e mãos de manipuladores de alimentos.....	33
5.2. Detecção de genes responsáveis pela produção de enterotoxinas.....	39
5.3. Teste de sensibilidade a antimicrobianos	43
6. DISCUSSÃO.....	44
7. CONCLUSÕES.....	50
8. BIBLIOGRAFIA.....	51

1. INTRODUÇÃO

Doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados por microrganismos 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).

Os manipuladores representam um papel importante 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).

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 métodos higiênicos inadequados na preparação de alimentos 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 & Foter (1965), quem realmente estudou os tipos de bactérias na pele, classificando-as em "residentes e transitórias". Os microrganismos presentes nas mãos são transitórios, representados principalmente por bactérias gram-negativas e são facilmente removidos por uma lavagem adequada com bons detergentes. Os microrganismos residentes, na maioria gram-positivos, encontram-se em equilíbrio dinâmico como parasitas ou saprófitas da 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.

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 microrganismo (HATAKKA et al., 2000).

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 nas fossas nasais 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).

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, produtos lácteos, saladas e doces (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989; VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características do *Staphylococcus*

Os *Staphylococcus* pertencem à família Micrococaceae, são cocos Gram positivos, medindo de 0,8 – 1,0 μm , que se dividem em mais de um plano formando cachos irregulares tridimensionais, esses microrganismos são imóveis, produzem catalase e são anaeróbios facultativos (ICMSF, 1996).

O *S. aureus* 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 desenvolvimento estiverem ótimas. Multiplicam-se em uma ampla faixa de pH (4,2 a 9,3) e em temperaturas de 7 a 48°C. O microrganismo 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 estimulam a emese e diarreia (BRYAN, 1980).

O gênero *Staphylococcus* está subdividido em 40 espécies, 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).

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 em 20 a 50% dos adultos, bem como, em pregas cutâneas, períneo, axilas, áreas inguinal e perineal (VON EIFF et al., 2001).

De acordo com Bannerman et al. (2003), cerca de metade das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa 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 o *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 & Scheifer (1983) o *S. auricularis* é uma das espécies mais isoladas no canal auditivo externo de humanos. O *S. caprae* e o *S. xylosus* são ocasionalmente isolados da pele de humanos, embora estejam amplamente distribuídos na natureza. O *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). O *S. hominis* e o *S. haemolyticus* colonizam regiões mais secas da pele embora também sejam encontrados em grande número nas regiões mais úmidas; ao contrario do *S. warneri* e o *S. lugdunensis* que são observados geralmente em baixas concentrações, embora distribuídos por todo o corpo. O *S. epidermidis* é a espécie predominante em humanos, isolado em grande número nas narinas anteriores, axilas, área inguinal e perineal (KLOOS & MUSSELWHITE, 1975).

Intoxicação alimentar estafilocócica (estafilotoxiose; estafiloenterotoxemia) é o nome da condição clínica causada pelas enterotoxinas produzidas por algumas linhagens de *Staphylococcus* enterotoxigênicos. 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 fluidos 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). 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 da enfermidade, 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 10^5 por grama. Segundo Balaban & Rasooly (2001), a dose mínima de enterotoxinas ingerida para a ocorrência desses sintomas é menor, de 10 ng.

2.2. Enterotoxinas estafilocócicas

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. As composições 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, 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 homologia 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), seqüenciaram o gene da toxina H. Su & 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*, apresenta a menor homologia entre as enterotoxinas, apresentando 218 nucleotídeos e, juntamente com a SEG, 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 plasmídio que a SED e os 269 aminoácidos que a 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). Existem poucos estudos sobre intoxicação estafilocócica envolvendo essas novas enterotoxinas (AKINEDEN 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).

Essas novas enterotoxinas tem sido designadas como membros da família das enterotoxinas estafilocócicas baseadas na sequência de similaridade com as enterotoxinas clássicas. O Comitê 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 SEIH, SEII e SEIG, que já apresentaram atividade emética (SU & WONG, 1995; MUNSON et al., 1998), o envolvimento das outras SEI em surtos de origem alimentar ainda não está totalmente esclarecido.

2.3. Intoxicações estafilocócicas

A primeira observação associando *S. aureus* à intoxicação alimentar ocorreu em Michigan e foi feita por Vaughan & Sternberg (1884), relacionada a um surto com queijo. Entretanto, a importância desse trabalho não foi reconhecida e o papel do *Staphylococcus* na intoxicação alimentar foi redescoberto em 1930 por Dack et al., que mostraram que o filtrado estéril da cultura de *S. aureus* isolado do recheio

de um bolo de Natal causou sintomas típicos de intoxicação alimentar em voluntários humanos (CUNHA, 1992).

Intoxicação por *S. aureus* é a segunda causa mais freqüente de doenças de origem alimentar na Espanha e na França, 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 & Bergdoll estimavam que 5% das intoxicações de origem alimentar causadas pelos estafilococos ocorreram devido a enterotoxinas não caracterizadas.

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 produziram 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.

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 freqüência 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).

De acordo com Al-Bustan et al. (1996), verificou-se a presença de *Staphylococcus aureus* na cavidade nasal de 26,6% dos 500 manipuladores de

alimentos dos restaurantes estudados, sendo que 86,6% dos microrganismos isolados foram positivos para produção de enterotoxinas: 28% SEA, 28,5% SEB, 16,4% SEC, 3,5% SED.

Em 1996, em um estudo realizado no sul da França, foram isoladas 213 cepas de *Staphylococcus aureus* e 51 de outras espécies de estafilococos produtores de enterotoxinas, presentes em diversos alimentos, sendo 65 e 9 dos isolados, 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).

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.

Rosec & Gigaud (2002) testaram 332 cepas de *Staphylococcus*, sendo 74 de ECN, quanto à presença dos genes das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEI. Nenhuma cepa de ECN apresentou genes para quaisquer toxinas. 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 freqüentes, 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”, 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 freqüência 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 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 & 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.

Nashev et al. (2004) estudaram 44 isolados de *S. aureus*, provenientes de esfregaços nasais de pessoas hígidas e com infecções cutâneas. 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 SEB e SEH.

Na Coréia 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 suíno 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. Conclui-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 os anos 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 as 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).

Segundo Bania et al. (2005), foram identificadas 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 enterotoxinas (SEA - SEE, SEG - SER) 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 produção de enterotoxinas. A toxina A 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 a toxina SEA e suas associações. Os isolados mais comumente encontrados foram para 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, com 16, 09, 07, 06, 06 isolados respectivamente.

Boerema et al. (2005) realizaram um estudo, na Nova Zelândia, comparando o perfil enterotoxigênico de uma coleção de culturas de 90 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas a partir de 21 amostras de bovinos (fossas nasais, couro, carcaça, cortes de carne), 27 de ovinos (fossas nasais, carcaça, cortes de carne), 26 de humanos (fossas nasais, olhos, feridas, furúnculos, etc) e 16 de alimentos contaminados (leite materno, 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 a produção de enterotoxinas (80,7%) comparadas com as isoladas de bovinos (61,9%) e de ovinos (63,0%). A enterotoxina mais comumente encontrada foi SEB, presente em 12 cepas, seguidas pela SEH, SEC, SEA, SEE COM 9, 7, 4, 2 respectivamente. Em amostras onde houve a presença de mais de uma toxina simultaneamente, a mais encontrada 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 produtoras de enterotoxinas (SEA a SED), sendo 57,1% em carne crua, 0,8% em carne salgada e 37,5% em defumada após salga. A enterotoxina mais comumente encontrada foi a SEA (50%) seguida pela SEC (25%) e pela SEA+SEC (12,5%), não sendo encontrada SED. No mesmo ano, Fueyo et al. (2005) 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%).

No Brasil, diversos autores relatam a presença de *S. aureus* em alimentos e manipuladores de alimentos. Pereira et al. (1994) verificaram intoxicação estafilocócica causada por um bolo recheado, onde doze pessoas foram afetadas após aproximadamente 4 horas da ingestão. O *S. aureus* produtor de SEA 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.

Tortas e doces comercializadas no município de Lavras – MG foram avaliados por Boari et al. (2001), que encontraram 50% delas fora do padrão quanto ao número de ECP, com contagens variando de $1,5 \times 10^3$ a $3,6 \times 10^7$ UFC/g,

que pode indicar falta de higiene na elaboração das tortas e/ou condições inadequadas de exposição e comercialização. Os números elevados encontrados em algumas amostras podem ser suficientes para produzir toxinas nas concentrações necessárias para causar intoxicação alimentar.

Carmo et al (2002) 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 microrganismo.

Acco et al. (2003) investigaram a presença de *S. aureus* em 47 manipuladores de uma indústria de alimentos, ocorrendo o isolamento do microrganismo em 14 (30%). Após análise 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.

Araújo (1998) isolou, a partir de amostras de leite cru, 201 cepas de *S. aureus*, as quais foram submetidas ao teste de antibiograma com discos impregnados com os seguintes antibacterianos: amicacina, ampicilina, cefalotina, cefoxitina, cloranfenicol, clindamicina, oxacilina, penicilina, tetraciclina, tobramicina e vancomicina. Com exceção de 88 (43,8%), 90 (44,8%), 24 (11,9%) e 40 (19,9%) cepas resistentes à penicilina, ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina, respectivamente, a maioria das 201 cepas foi sensível aos antibióticos utilizados. Em Maringá-PR, foram avaliados 16 antimicrobianos utilizados na profilaxia ou terapêutica de infecções comunitárias de tecido cutâneo e subcutâneo. Das 107 amostras de pacientes com queixa de infecções com abscedação da pele e tecido subcutâneo, 71 (66,4%) foram positivas para *Staphylococcus aureus*. Na

avaliação de susceptibilidade, constatou-se uma maior sensibilidade à vancomicina, amicacina, teicoplanina, cefoxitina (100%), cefalotina (98,5%), lincomicina (98,5%), gentamicina (98,2%), oxacilina (96,4%), norfloxacina (95,8%) e sulfazotrim (95,8%), quando comparados à penicilina G (8,5%), tetraciclina (8,4%), ampicilina (90,1%), canamicina (81,7%), eritromicina (88,4%) e cloranfenicol (94,4%), evidenciando uma alta taxa de resistência às penicilinas, restringindo seu uso no tratamento e profilaxia de infecções estafilocócicas (ZAVADINACK NETO et al., 2001).

Em Porto Alegre, foi investigada a presença de *Staphylococcus aureus* em 47 manipuladores de alimentos, sendo encontrado em 14 (30%). A partir das cepas isoladas, comparou-se o perfil de sensibilidade a antimicrobianos, encontrando 70% e 45% das cepas resistentes a penicilina e amoxacilina + ácido-clavulônico, respectivamente. Todos os isolados foram sensíveis a vancomicina, rifampicina, oxacilina, cloranfenicol, gentamicina, eritromicina, amicacina, cefalotina (ACCO et al., 2003). Ficca et al. (2006) coletaram 1079 amostras de fossas nasais de voluntários de uma comunidade francesa, encontrando 254 (4,3%) cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, macrolídeos e cotrimoxazole.

O perfil de resistência de microrganismos é de relevância clínica em pacientes hospitalizados, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, sendo relatado por Berns (2003), que isolou *Staphylococcus* coagulase-negativa com resistência intermediária a vancomicina. Archer (1988) enfatizou que *Staphylococcus* são reservatórios de vários genes de resistência, pois sofrem freqüente pressão dos antimicrobianos usados, por serem componentes da microbiota da pele e mucosas.

Assim, os manipuladores de alimentos podem ser importantes disseminadores de patógenos, como os estafilococos, principalmente através dos alimentos, sendo importante o conhecimento da microbiota presente nas mãos e fossas nasais desses indivíduos, além do potencial patogênico de cada espécie.

3. OBJETIVOS

3.1. Identificar *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa nas fossas nasais e mãos de manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares e industriais na cidade de Botucatu.

3.2. Detectar os genes responsáveis pela produção das enterotoxinas tipos A, B, C, D, E, G, H, I e J, a partir das cepas isoladas.

3.3. Comparar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos, das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas a partir das cozinhas hospitalares e industriais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta do material para análise

As amostras das mãos e/ou fossas nasais foram coletadas de 82 manipuladores, de 3 cozinhas, assim distribuídos:

A cozinha hospitalar do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu (Cozinha A) conta com 50 manipuladores de alimentos e oferece cerca de 3.200 refeições diárias, atendendo pacientes, médicos e funcionários. A cozinha industrial (Cozinha B) de uma fábrica de aviões, possui 17 manipuladores, que preparam, aproximadamente, 1.000 refeições por dia. A cozinha C é a Cozinha Piloto da Prefeitura de Botucatu, com 15 manipuladores que preparam as refeições de todas as escolas públicas e creches da cidade, perfazendo, aproximadamente, 17 mil refeições por dia.

A coleta foi realizada com o auxílio de uma zaragatoa e ocorreu durante o preparo das refeições nas cozinhas visitadas. A zaragatoa foi umedecida com solução salina, antes da coleta e foi friccionada na palma de ambas as mãos e entre os dedos dos manipuladores. As fossas nasais também foram amostradas, pela fricção de outra zaragatoa no vestíbulo nasal. Após a coleta, as zaragatoas foram recolocadas em seus tubos de ensaio e imediatamente levadas ao Laboratório do Departamento de Microbiologia e Imunologia para a realização das análises microbiológicas.

4.2. Isolamento e identificação de estafilococos (LANCETTE & BENNETT, 2001)

Para o isolamento dos estafilococos, a zaragatoa foi espreitada na superfície de placas de Petri com ágar Baird-Parker (Difco) suplementado com telurito de potássio e solução de gema de ovo (Inlab). Após a incubação a 35°C por 48 horas, foi realizada a contagem das colônias características, que apresentam cor negra, com halo e até três colônias foram repicadas para tubos com ágar tripticase soja (TSA – Difco) inclinado, que foram incubados por 24 horas a 35°C. Para identificação da cultura foi realizado o teste da produção de catalase, uma porção do crescimento foi transferido, para uma lâmina de vidro, com a adição uma gota de peróxido de hidrogênio.

Como controle positivo, foi utilizada uma cepa de *S. aureus* e como controle negativo, uma de *Streptococcus* sp. O teste positivo é revelado pela liberação de bolhas significando que a catalase hidrolisou o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. A seguir, foi realizado o teste da coagulase em tubo, onde 0,5 ml de plasma de coelho foi acrescido de um volume igual de uma cultura da cepa teste em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI - Difco), crescida 24 horas a 35°C. Os tubos foram incubados a 35°C por até 24 horas. O teste foi considerado positivo quando ocorreu a coagulação.

As cepas identificadas como estafilococos coagulase positiva foram submetidas ao teste pelo kit "Staphytest Test Dry Spot" (Oxoid), onde partículas azuis de látex são recobertas com fibrinogênio humano e imunoglobulinas tipo G contra a proteína A de *S. aureus*, o "Fator Clumping" e a cápsula de *S. aureus* metilicina-resistente. O kit é acompanhado por um controle negativo, com glóbulos vermelhos não sensibilizados. A cepa a ser testada foi cultivada em TSA inclinado. Após incubação por 24 horas, a 35°C, uma alçada do crescimento foi colocada sobre uma gota de água tamponada esterilizada, previamente depositada num papelão de fundo branco, que acompanha o kit. Com o auxílio da alça de níquel-cromo, foi realizada a homogeneização. As cepas positivas formaram grânulos devido à aglutinação, em até 6 segundos. Procedimento igual foi repetido, usando-

se o reagente não sensibilizado, como controle negativo. A diferenciação entre as duas espécies clumping positivo (*S. aureus* e *S. intermedius*), foi realizada pela prova de VP, cujo resultado é positivo para *S. aureus*.

As cepas de estafilococos coagulase negativa foram identificadas segundo Cunha et al. (2004), onde foram realizadas os testes de fermentação de açúcares como xilose, sacarose, trealose, maltose e manitol e verificação da produção de β hemólise, descarboxilação da ornitina, degradação da uréia, resistência a novabiocina e desenvolvimento anaeróbio em meio tioglicolato.

4.3. Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos

As cepas de ECP isoladas e identificadas foram submetidas a testes de susceptibilidade a alguns antimicrobianos, através do método Kirby-Bauer, com discos impregnados (BAUER et al, 1959). Os isolados a serem testados foram repicados em tubos com caldo de infusão de cérebro e coração (BHI –Difco), que foram incubados a 35°C/24 h. Após esse período, com o auxílio de uma solução salina, o crescimento foi ajustado numa concentração de, aproximadamente 10^8 UFC/mL (escala 0,5 de MacFarland) e, com auxílio de uma zaragatoa esterilizada, o inóculo foi espalhado na superfície de uma placa com ágar Mueller – Hinton (Difco). Após a absorção completa do inóculo, os discos foram acondicionadas sobre o ágar com o auxílio de uma agulha esterilizada.

Foram usados os seguintes antimicrobianos (Cefar diagnóstica Ltda): penicilina G (10 U.I.), oxacilina (1 μ g), cefoxitina (30 μ g), netilmicina (30 μ g), eritromicina (15 μ g), levofloxacina (5 μ g), rifampicilina (5 μ g), vancomicina (30 μ g), amoxilina (30 μ g) (NCCLS, 2002).

As cepas foram consideradas resistentes, de sensibilidade intermediária ou sensíveis de acordo com uma tabela de mensuração dos halos para cada antimicrobiano usado, fornecido pelo fabricante dos discos impregnados.

4.4. Detecção dos genes produtores de enterotoxinas

4.4.1. Extração e purificação de DNA

Para extração e purificação do DNA, cada uma das cepas isoladas foram cultivadas em caldo BHI, a 35°C/24 h e 1 mL de cada cultivo foi transferido para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL (Axygen) e submetidos a extração e purificação do DNA empregando-se o kit comercial “GFX” (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

Para tal, o tubo foi centrifugado em rotação máxima (15.700 g) por 30 segundos (Eppendorf 5415R), o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 40µL de tampão de lisozima e imediatamente homogeneizado com o auxílio de um vortex, para ressuspensão das células bacterianas. Em seguida, foram adicionados 10 µL lisozima (USB - 10mg/mL), o tubo foi homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por 15 minutos, com homogeneização ocasional. Após, foram adicionados 10µL de proteinase K (USB - 20 mg/mL), homogeneizado e incubado a 55°C/ 15 minutos, homogeneizando ocasionalmente. Após o período de incubação, foram adicionados 500µL de solução de extração, homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por 10 minutos.

A mistura foi transferida para uma coluna GFX e centrifugada a 5.000 g durante 1 minuto. O volume filtrado foi descartado e novamente foram adicionados 500µL de solução de extração na coluna que foi centrifugada a 5.000 g por 1 minuto, descartando-se o volume filtrado. Em seguida, foram adicionados 500µL de solução de lavagem e centrifugado a 13.400 g por 3 minutos, com descarte do filtrado. A coluna foi transferida para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL (Axygen), com adição de 500µL de solução de eluição (água Milli Q autoclavada e previamente aquecida a 56°C em banho-maria), incubado à temperatura ambiente por 1 minutos e centrifugado a 5.000 g durante 1 minuto. A amostra foi congelada a - 20°C até o momento do uso para a reação em cadeia pela polimerase (PCR).

4.4.2. Amplificação do ácido nucléico (PCR)

Para as reações de PCR foram utilizados tubos de microcentrífuga de 0,5 mL (Axygen) num volume total de 25 μ L, composto por 2,5 μ L de PCR Buffer 10x (Invitrogen), 2,0 μ M de Cloreto de Magnésio (Invitrogen), 200 μ M de cada dNTP (Invitrogen), 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 10 picomoles de cada *primer* (Quadro 1), água ultrapura autoclavada (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) e 3 μ L da amostra de DNA. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) empregando-se os parâmetros de um ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, 94°C durante 2 minutos para desnaturação e 72°C durante 1 minuto para extensão. Em relação à temperatura de anelamento dos “primers”, para as toxinas A, B, C, D, E, I e J, foi utilizada a temperatura inicial de 50°C, com redução de 1°C por ciclo, nos 4 ciclos seguintes. No sexto ciclo, a temperatura de anelamento se encontrava a 45°C, sendo mantida para os próximos 25 ciclos. Ao final dos 30 ciclos a temperatura de extensão final foi de 72°C por 5 minutos e resfriamento a 4°C. Para a toxina G e H, todos os parâmetros foram os mesmos, com exceção das temperaturas de anelamento, que foram de 55°C e 46,4°C, respectivamente, conforme Quadro 1. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água ultrapura. Os controles positivos usados foram *S. aureus* ATCC 13565 (SEA), ATCC 14458 (SEB), ATCC 19095 (SEC), FRI 361 (SED, SEG, SEI e SEJ), ATCC 27664 (SEE) e FRI 137 (SEH).

4.4.3. Visualização dos produtos amplificados

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese (Electrophoresis Power Supply Model EPD 600 – Amersham-Pharmacia Biotech Inc.) em gel de agarose 1,5% (Sigma Aldrich) em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com brometo de etídio (0,5 mg/ml - Invitrogen). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA

de 50 bp (50 Base Pair Ladder – Amersham – Pharmacia Biotech Inc.), sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (AlphaImager – Alpha esasy FC Software – AlphaInotech Corporation).

Quadro 01: Oligonucleotídeos e seus propriedades utilizados na detecção de *Staphylococcus* coagulase positiva ou negativa, produtores de toxinas A, B, C, D, E, G, H e I, J.

Gene	Primer	Seqüência	Tamanho produto (bp)	Temperatura de anelamento	Referências
Sea	SEA-1	ttggaaacgggttaaaccgaa	120	50°C	JOHNSON et al. (1991)
	SEA-2	gaaccttcccatcaaaaaca			
Seb	SEB-1	tcgcatcaaactgacaaacg	478	50°C	JOHNSON et al. (1991)
	SEB-2	gcaggtactctataagtgcc			
Sec	SEC-1	gacataaaagctaggaattt	257	50°C	JOHNSON et al. (1991)
	SEC-2	aaatcggattaacattatcc			
Sed	SED-1	ctagtttggtaatatctcct	317	50°C	JOHNSON et al. (1991)
	SED-2	taatgctatatcttataggg			
See	SEE-1	aggtttttcacagggtcatcc	209	50°C	MEHROTRA et al. (2000)
	SEE-2	cttttttcttcgggtcaatc			
Seg	SEG-1	aagtagacattttggcggtcc	287	55°C	OMOE et al. (2002)
	SEG-2	agaaccatcaaactcgtatagc			
Seh	SHE-1	gtctatatggaggtacaacact	213	46,4°C	OMOE et al. (2002)
	SHE-2	gacctttacttatctcgctgtc			
Sei	SIE-1	ggtgatattggtgtaggtaac	454	50°C	OMOE et al. (2002)
	SIE-2	atccatattcttgcctttaccag			
Sej	SEJ-1	catcagaactgtgttccgctag	142	50°C	NASHEV et al. (2004)
	SEJ-2	ctgaattttaccatcaaaggtag			

4.5. ESTATÍSTICA

Os dados relativos à proporção de *Staphylococcus* coagulase negativa e positiva das cepas isoladas bem como a proporção de cepas toxigênicas foram submetidos ao teste de comparação de proporções (teste z). O software empregado foi o Sigma Stat (Jandel Corporation) e o nível de significância adotado foi de 5%.

A comparação de proporção entre vários grupos (produção das diferentes enterotoxinas pelos estafilococos) foi realizada utilizando-se o Teste de Tukey, de acordo com ZAR (1996).

5. RESULTADOS

5.1. ECP e ECN Identificados nas fossas nasais e mãos de manipuladores de alimentos.

A presença de estafilococos coagulase negativa ou positiva foi pesquisada em 82 manipuladores de alimentos de 3 cozinhas industriais diferentes, de 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%). Essa diferença entre o número de isolamentos de ECN e ECP foi estatisticamente significativa ($z = 6,503$; $p < 0,001$).

Na Figura 1 estão representadas as frequências dos estafilococos isolados dos manipuladores de alimentos das três cozinhas. Da 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 de 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 1 pode-se observar que em 11 (30,6%) das 36 fossas nasais amostrada, não foi isolado ECP + ECN. 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

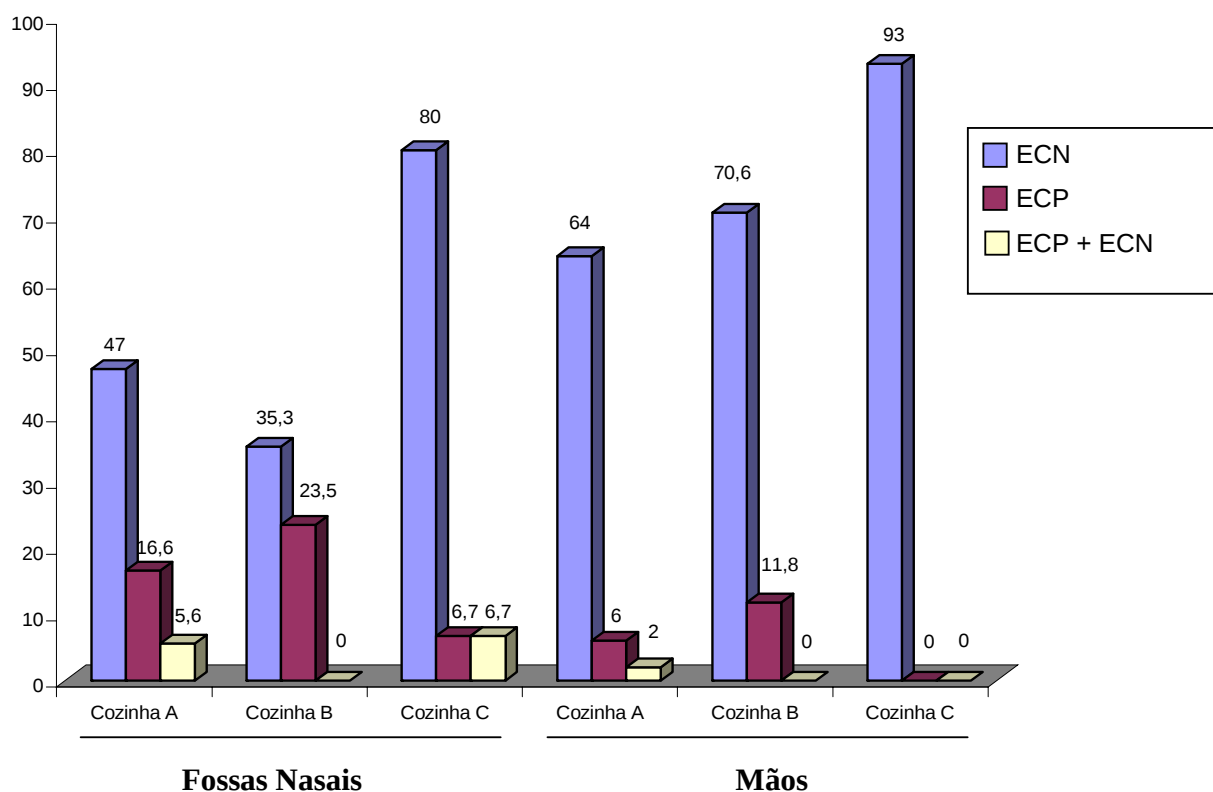


Figura 1: Frequência e associações entre estafilococos coagulase negativa ou positiva, isolados a partir das fossas nasais e mãos de manipuladores de 3 cozinhas.

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 microrganismo nas fossas nasais.

A Tabela 2 apresenta o perfil de contaminação dos manipuladores, quanto ao local de coleta e espécie de *Staphylococcus* encontrada. Considerando-se os dois sítios analisados, foi possível o isolamento de *S. warneri* em quatro manipuladores (um deles também com *S. aureus* nas fossas nasais) e *S. aureus* foi isolado das mãos e fossas nasais de dois indivíduos.

Pela Figura 1 também observam-se os dados da cozinha B (cozinha industrial) onde foram analisadas as mãos e fossas nasais de 17 manipuladores. A partir dos esfregaços das fossas nasais, foram encontradas 6 (35,4%) amostras positivas para *Staphylococcus* coagulase-negativa e 4 (23,5%) para

Tabela 01: 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) N = 36 (FN)	17 (47,2%)	6 (16,7%)	2 (5,6%)	11 (30,6%)	32 (64%)	3 (6%)	1 (2%)	14 (28%)
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

Staphylococcus coagulase-positiva. 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.

Tabela 2: Perfil de contaminação dos manipuladores, quanto ao local de coleta e espécie de *Staphylococcus* encontrada

Perfil de contaminação do manipulador	Cozinha A
<i>S. warneri</i> (M) + <i>S. warneri</i> (FN) + <i>S. aureus</i> (FN)	1
<i>S. warneri</i> (FN)	3
<i>S. warneri</i> (M)	14
<i>S. aureus</i> (FN) + <i>S. aureus</i> (M)	2
<i>S. capitis</i> (FN)	1
<i>S. epidermidis</i> (FN)	2
<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> (M)	1
<i>S. aureus</i> (M)	1
<i>S. aureus</i> (FN)	4
<i>S. epidermidis</i> (M) + <i>S. warneri</i> (FN)	1
<i>S. epidermidis</i> (FN) + <i>S. warneri</i> (M)	1

FN: fossas nasais
M: mãos

Somente 2 cepas de ECN isoladas das mãos puderam ser identificadas, sendo o *S. warneri*, a única espécie encontrada. A detecção simultânea de ECP e ECN não ocorreu. Pela Tabela 1, pode-se observar que *Staphylococcus* sp. não foi observado em 7 (41,2%) e 3 (17,6%) amostras de fossas nasais e mãos, respectivamente, entre as 17 analisadas.

Na Tabela 3 pode-se observar o perfil de contaminação dos manipuladores, quanto ao local de coleta e espécie de *Staphylococcus* encontrada

Tabela 3: Perfil de contaminação dos manipuladores, quanto ao local de coleta e espécie de *Staphylococcus* encontrada

Perfil de contaminação dos manipuladores	Cozinha B
<i>S. warneri</i> (M)	1
<i>S. aureus</i> (FN) + <i>S. aureus</i> (M)	1
<i>S. warneri</i> (M) + <i>S. aureus</i> (FN)	1
<i>S. aureus</i> (M)	1
<i>S. aureus</i> (FN)	2

FN: fossas nasais
M: mãos

Ainda pela Tabela 1, pode-se verificar que na cozinha C foram analisados 15 manipuladores. A partir 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. Quanto aos resultados das análises das mãos, foram observadas 14 (93,3%) amostras positivas para *Staphylococcus* coagulase-negativa. ECP não foi detectado em nenhuma das amostras Segundo a Tabela 1, um (6,7%) manipulador não apresentou estafilococos nas fossas nasais ou mãos e outro apresentou os dois grupos, simultaneamente.

Entre os ECN 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%).

A Tabela 4 apresenta o perfil de contaminação dos manipuladores, quanto ao local de coleta e espécie de *Staphylococcus* encontrada

Tabela 4: Perfil de contaminação dos manipuladores, quanto ao local de coleta e espécie de *Staphylococcus* encontrada

Perfil de contaminação do manipulador	Cozinha C
<i>S. warneri</i> (M) + <i>S. warneri</i> (FN) + <i>S. aureus</i> (FN)	1
<i>S. epidermidis</i> (FN)	1
<i>S. epidermidis</i> (M)	3
<i>S. aureus</i> (FN)	1
<i>S. epidermidis</i> (M) + <i>S. warneri</i> (FN)	1
<i>S. epidermidis</i> (FN) + <i>S. warneri</i> (M)	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 37 (45,1%) para *S. warneri*, 23 (28%) para *S. Epidermidis*, 20 (24,4%) para *S. aureus* e 1 (1,2%) para as espécies *S. capitis* e *S. xylosus*, segundo Figura 2.

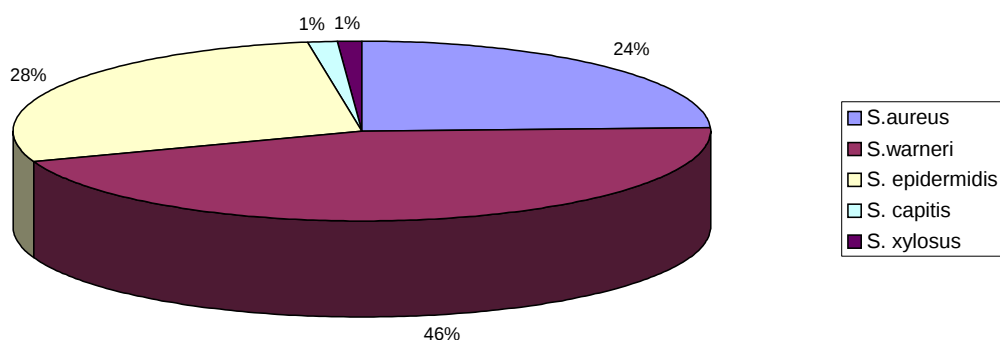


Figura 2: Distribuição das espécies de *Staphylococcus*, isoladas a partir de 82 manipuladores de alimentos, em três cozinhas industriais, na cidade de Botucatu.

5.2. Detecção dos genes responsáveis pela produção das enterotoxinas.

Os primers utilizados nesse trabalho, na análise pela PCR (JOHNSON et al., 1991; MEHROTRA et al., 2000; OMOE et al., 2002; NASHEV et al., 2004) geraram os produtos observados na Figura 3. foram utilizadas cepas padrão de *S. aureus*, a saber: 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).

Na tabela 5 estão representados 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. Houve diferença estatística entre o número de cepas enterotoxigênicas de ECP e ECN ($z= 3,530$; $p< 0,001$).

Entre as 20 cepas de ECP, 19 (95%) foram positivas para um ou mais genes que codificam para as diversas enterotoxinas pesquisadas e 11 genótipos distintos foram observados, conforme Tabela 5.

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 em três (23%) e SEB em um (7,7%). O gene da enterotoxina D não foi observado em nenhuma das cepas testadas. Com exceção de uma cepa, que apresentou o gene SEC, isoladamente, todas as outras apresentaram simultaneamente, pelo menos, genes para produção de 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 número de cepas positivas foi maior, pois 18 isolados (94,7%) entre os 19 produtores apresentaram genes para a síntese de, pelo menos, um tipo. As mais frequentes foram a SEG, ocorrendo em 11 (61,1%) cepas, a SEI, em 9 (50%) e as enterotoxinas H e J, com 7 (38,9%) e 5 (27,8%), respectivamente. A produção de somente um tipo toxigênico foi observada em 5 cepas produtoras de SEH.

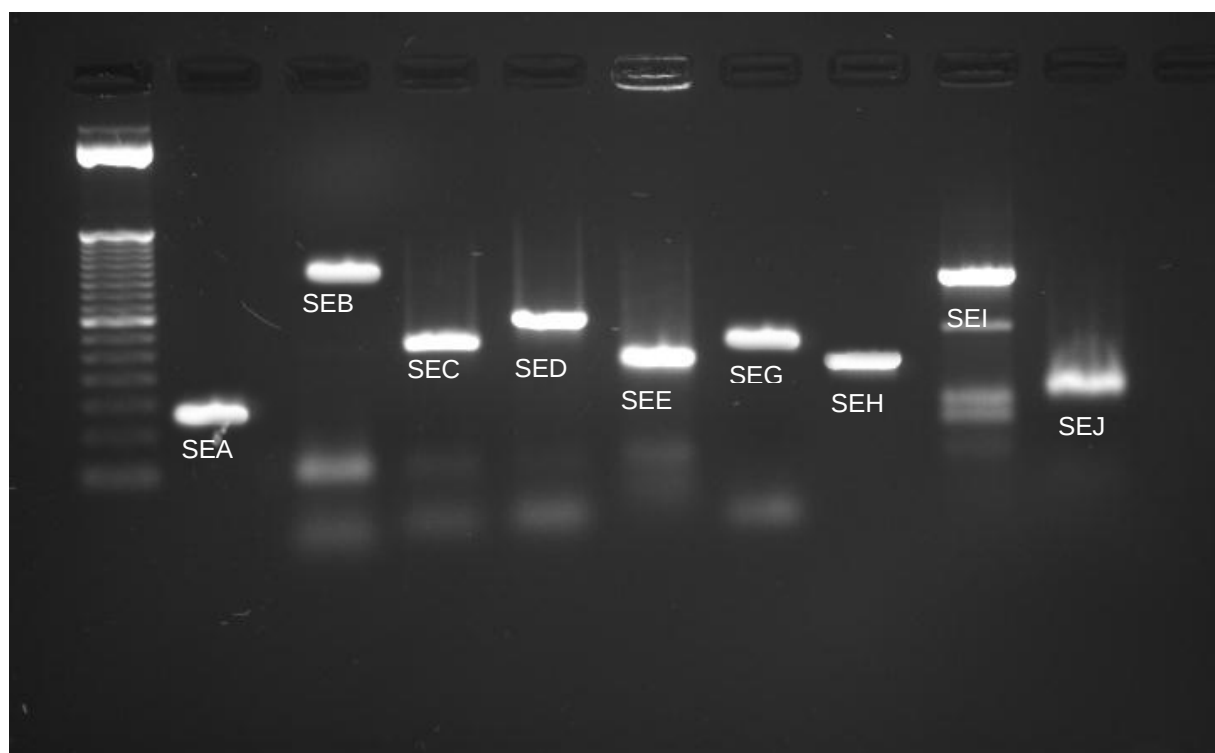


Figura 3: Gel de eletroforese do produto da PCR das toxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J de *Staphylococcus aureus*

Tabela 5: Presença de genes produtores de toxinas em *Staphylococcus* coagulase negativa ou positiva em fossas nasais e mãos de manipuladores de alimentos.

Toxina	ECN				ECP	
	Mãos	Espécie	FN	Espécie	Mãos	FN
A	2	<i>S. warneri</i>	2	<i>S. warneri</i>	-	-
	1	<i>S.epidermidis</i>	1	<i>S.epidermidis</i>		
B	1	<i>S.epidermidis</i>	3	<i>S.epidermidis</i>	-	-
	1	<i>S. warneri</i>				
C	-		-		-	1
D	-		-		-	-
E	-		1	<i>S. warneri</i>	-	-
G	-		-		-	-
H	2	<i>S. warneri</i>	1	<i>S. warneri</i>	1	3
			1	<i>S.epidermidis</i>		
I	-		-		-	-
J	2	<i>S. warneri</i>	1	<i>S. warneri</i>	-	-
	1	<i>S.epidermidis</i>	2	<i>S.epidermidis</i>		
A + J	-		-		-	1
C + E	-		1	<i>S. warneri</i>	-	-
			1	<i>S. capitis</i>		
G + I	0		0		-	1
H + J	2	<i>S. warneri</i>	1	<i>S. warneri</i>	-	1
A + G + I	1	<i>S. warneri</i>	1	<i>S. warneri</i>	1	2
B + G + I	-		-		-	1
C + G + J	-		-		1	1
A+E+G + I	-		-		1	2
A+E+H+J	-		-		-	1
A+G+H+I	-		-		-	1

Legenda:

ECN: estafilococos coagulase negativa

ECP: estafilococos coagulase positiva

FN: fossas nasais

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 simultaneo 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 simultâneo, 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 isolado, ainda, uma cepa de *S. xyloso*, 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 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 4. Não houve diferenças estatísticas entre as toxinas testadas ($p > 0,05$).

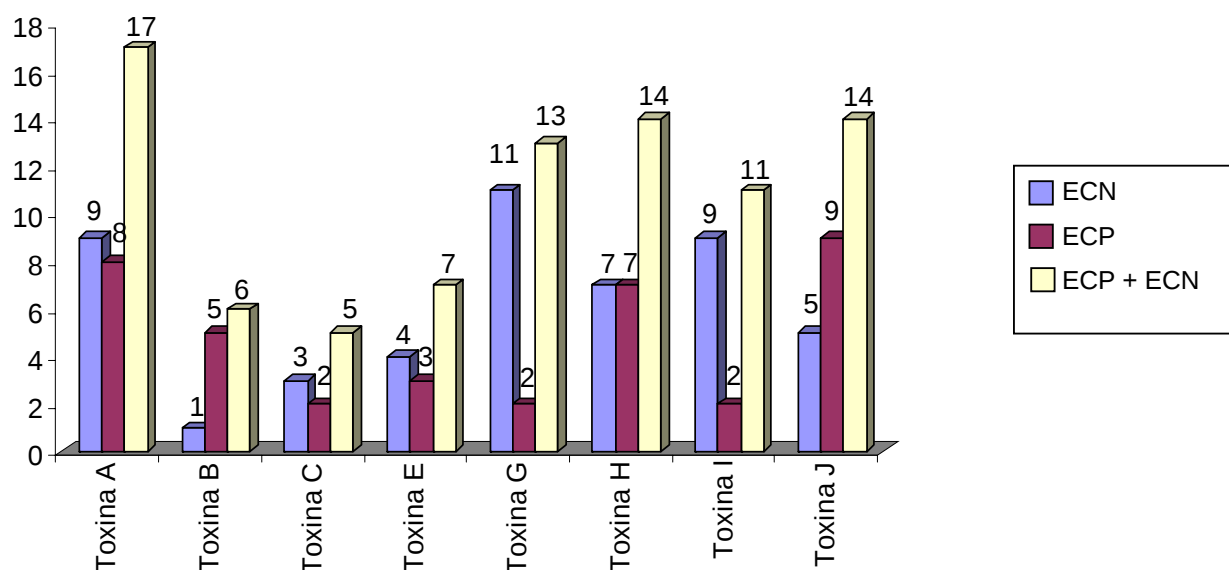


Figura 4. Distribuições das cepas isoladas de acordo com a presença dos genes produtores das enterotoxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J entre os estafilococos coagulase negativa e positiva.

5.3. Teste de Sensibilidade aos antimicrobianos.

Os ECP isolados das cozinhas foram submetidos ao teste de sensibilidade à fármacos, para a verificação da presença de cepas resistentes à metilicina. Foram testadas 18 cepas de *Staphylococcus* coagulase-positiva, isoladas de fossas nasais (13) e mãos (5) e 15 cepas se mostraram resistentes a penicilina (83,3%), sendo que dessas uma (5,6%) das cepas também apresentou resistência a rifampicina e outra, à amoxicilina. Todas foram sensíveis a oxacilina, cefoxetina, netilmicina, eritromicina e levofloxacina.

6. DISCUSSÃO

As mãos dos manipuladores de serviços de alimentação podem ser vetores na disseminação de doenças de origem alimentar, devido higiene pessoal inadequada ou contaminação cruzada (BAS et al., 2006). Segundo Howes et al. (1996), um estudo realizado nos Estados Unidos sugere que práticas não apropriadas na manipulação de alimentos contribuem com até 97% das doenças de origem alimentar em restaurantes e residências e *S. aureus* é um dos patógenos mais importantes nessas doenças.

Neste trabalho, pesquisou-se a presença de ECP ou ECN 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 coagulase-positiva (24,4%).

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 microrganismo 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 microrganismo 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 Witt & Kampelmacher (1988) e Taskanal (1993), com 77,8% e 74,6%, respectivamente.

No Brasil, Raddi et al (1988) observaram índices bem mais altos do que o 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 microrganismo.

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 microrganismos em altas concentrações, nas mãos de manipuladores, pode ser considerado um risco à saúde pública.

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. Quanto aos ECN, mais recentemente, têm sido envolvidos em intoxicações de origem alimentar, devido produção de toxinas (UDO et al., 1999).

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 & 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 trabalho 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.

No presente trabalho, entre essas 13 cepas de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas clássicas, a enterotoxina A foi a mais observada, ocorrendo em 9 isolados (69,2%), seguida de 4 cepas positivas para SEE (30,8%), 3 para SEC (23,1%) e 1 (7,7%) para SEB. Nashev et al. (2004) observaram baixa positividade para a toxina D, de somente 4,5% entre os manipuladores amostrados. 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.

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 ao obtidos no presente trabalho. As toxinas A e B apresentaram prevalência semelhantes, de 28% e 28,5%, respectivamente. SEC ocorreu em 16,4% das cepas e SED em somente 17 (3,5%) manipuladores. A toxina A tem sido descrita como a mais comum por muitos outros autores como Bergdoll (1990), Jablonski & Bohachi (1997), Peacock et al. (2002) e Normanno et al. (2005).

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 & 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 por 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.

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 microrganismo apresentaram positividade para quatro toxinas (B-G-H-I) e 4,5%, para cinco (A-D-G-I-J). 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 ECN 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 & 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 & Hellberg (1977), esse número cairia 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 e o perfil de sensibilidade a antimicrobianos. No presente estudo, entre as 18 cepas de ECP estudadas, isoladas de fossas nasais (13) e mãos (5), submetidas ao teste de sensibilidade a antimicrobianos, 15 isolados se mostraram resistentes a penicilina (83,3%), sendo que uma (5,6%) das cepas também apresentou resistência a rifampicina e outra, à amoxicilina. Todas foram sensíveis a oxacilina, cefoxetina, netilmicina, eritromicina e levofloxacina.

No Brasil, Araújo (1998) observou que 95% das 201 cepas de *S. aureus* foram sensíveis a cefoxitina, clindamicina, oxacilina, tobramicina e vancomicina, entretanto somente 43,8% foram resistentes a penicilina, valor inferior ao observado nesse estudo. Zavadinack Neto et al. (2001) na avaliação de susceptibilidade, constatou-se uma maior sensibilidade à vancomicina (100%), amicacina (100%), teicoplanina (100%), cefoxitina (100%), cefalotina (98,53%), lincomicina (98,53%), gentamicina (98,2%), oxacilina (96,4%), norfloxacina (95,77%) e sulfazotrim (95,77%), quando comparados a penicilina G, onde 91,6%

apresentaram resistências, valor bem mais próximo ao do atual trabalho. Segundo o autor, essa alta taxa de resistência à penicilina restringe seu uso no tratamento e profilaxia de infecções estafilocócicas.

No Rio Grande do Sul, Acco et al. (2003) testaram cepas de *S. aureus* isolados de fossas nasais de manipuladores e encontraram resultados semelhantes quanto à resistência a penicilina, de 70%, mas encontrou 45% das cepas de resistentes a amoxicilina + ácido-clavulônico, valores bem maiores aos observados no presente trabalho. Ainda segundo esses autores, todas as cepas foram sensíveis a vancomicina, rifampicina, oxacilina, clorafenicol, gentamicina, eritromicina, amicacina, cefalotina.

Ficca et al. (2006) encontraram 254 (4,3%) cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina, e determinados mecanismos de resistência quando comparados com aminosídeos, macrolídeos e cotrimoxazole. Segundo NCCLS (2002) linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina ou oxacilina devem ser também reportadas como resistentes às cefalosporinas e aos carbapenems, do ponto de vista clínico.

Archer & Climo (1994) observaram a associação entre o aumento da frequência percentual dos *Staphylococcus* coagulase-negativa na etiologia de infecções e a resistência desses microrganismos aos agentes antimicrobianos. Como exemplo Berns (2003), que isolou ECN com resistência intermediária a vancomicina. A elevada transmissibilidade de plasmídeos entre esses microrganismos e o uso abusivo de antimicrobianos têm constituído em importantes fatores à seleção de amostras multi-resistentes e a transferência de genes de resistência (SCHABERG et al., 1991).

A resistência a diversos antibióticos tem sido notada em hospitais, principalmente em relação à penicilina, oxacilina, clorafenicol, cefalotina (SANTOS SANCHES et al., 1995, UDO et al., 1996) e as amostras isoladas de indústrias de alimentos, geralmente apresentam pequena resistência a antibióticos (SOARES et al., 1997, UDO et al., 1999).

7. CONCLUSÕES

- A partir das fossas nasais e mãos dos manipuladores de alimentos das três cozinhas foram isolados estafilococos coagulase positiva e negativa, com a predominância de ECN.

- Ocorreu a produção das toxinas clássicas (SEA a SEE) e das mais recentes (SEG, SEH, SEI e SEJ) pelos ECP e ECN. A pesquisa das novas SES aumentou consideravelmente a porcentagem de cepas enterotoxigênicas dos dois grupos, aumentando assim, o potencial patogênico dessas bactérias.

- Pelos resultados encontrados pode-se concluir que os ECP foram mais importantes em sua capacidade de produzir enterotoxinas quando comparados com ECN. Porém, os ECN, que sempre foram considerados contaminantes de alimentos sem despertar grande atenção, mostraram-se potencialmente patogênicos em relação à produção das enterotoxinas analisadas.

- Não foram observadas cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva resistentes à mais que três antibióticos, simultaneamente, tanto na cozinha hospitalar, como nas duas industriais.

- Mais estudos são necessários, principalmente, em relação aos ECN, para comprovar seu caráter patogênico, em casos de doenças de origem alimentar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 Microbiol.**, v. 20, p. 489-493, 2003.
- AKINEDEN, O.; ANNEMULLER, C.; HASSAN, A. et al. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clin. Diagnostic Lab. Immun.**, 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 Kwait city. **Epidemiology and Infection**, v. 116, p. 319-322, 1996.
- 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.
- 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 Protect.**, v. 3, p. 381-385, 2000.
- ARAÚJO, W. P. Phage typing strains of *Staphylococcus aureus* resistant to antibiotics, isolated from milk. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.35, n. 4, 1998.
- ARCHER, G. L. Molecular epidemiology of multiresistent *Staphylococcus epidermidis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 21, p.133-138, 1988.
- ARCHER, G. L; CLIMO, M. W. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 38, p. 2231-2237, 1994.
- 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. **Food Microbiol.**, v. 68, p. 105-113P., 2001.
- 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.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Analytical chromatography for recovery of small amounts of staphylococcal enterotoxins from food. **J. Clin. Microbiol.**, v. 64, p. 33-40, 2001.
- 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 Microbiology**; p.384-404, 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. **Food Microbiol.**, v. 108, n. 1, p. 36-41 2006.
- 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**, v. 17: p. 317-322, 2006.
- BAUER, A.W.; PERRY, D. M.; KIRBY, W. M. M. Single-disk antibiotic-sensitive testing of staphylococci. **Arch. Intern. Med.**, v. 104, p. 208-16, 1959.
- BAYLES, K.W.; IANDOLO, J.J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 4799- 4806, 1989.
- BERCKER, K.; FRIEDRICH, A.W.; LUBRITZ, G. et al. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1434-1439, 2003.
- BERGDOLL, M.S. & ROBBINS, R.N. Characterization of types staphylococcal enterotoxins. **J. Milk Food Technol.**, v. 36, p. 610-2, 1973.
- BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P. **Bacterial foodborne pathogens**. New York: Marcel Dekker, p. 464-523, 1989.
- BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Food. Microbiol.**, v.10, p. 91-100, 1990.

BERNS, J. S. Infection with antimicrobial-resistant microorganisms in Dialysis patients. **Seminars in Dial**, v.16, n. 1, p. 30-37, 2003.

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.* **Chem. Immunol.**, v. 55, p.1-35, 1992.

BOARI, C.A.; MARQUES, S.C.; NASCIMENTO, A.R. et al. Avaliação microbiológica de tortas doces comercializadas no município de Lavras – MG, *Resumos nos Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu, PR*, 2001.

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*. **Food Microbiol.**, 2005.

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

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

CARDOSO, R.C.V., CHAVES, J. B. P., ANDRADE, N. J. et al. 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, 14, 1994, São Paulo. Resumos. São Paulo: SBCTA, p. 117, 1994.

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 Microbiol.**, 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 Arch. of Biol. Technol.**, v. 46, n. 4, p. 581-586, 2003.

- 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. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 92, p. 189-197, 2004.
- COUCH, J.L.; BETLEY, M.J. Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 4507-4510, 1989.
- 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.
- CRASS, B.A.; BERGDOLL, M.S. Involvement of coagulase negative staphylococci in Toxic Shock Syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, **23**: 43-45, 1986.
- CRISLEY, F. D. & FOTER, M. J. The use of antimicrobial soaps and detergents for hand washing in foodservice establishments. **J. Milk Food Technol.**, v. 28, p. 278-84, 1965.
- CUNHA, M.L.R.S. Estafilococos enterotoxigênicos: efeito de cultura mista em leite, extrato de soja e parâmetros causadores de injúria celular. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Londrina, 200p., 1992.
- CUNHA, M.L.R.S; SINZATO, Y.K. & SILVEIRA, L.V.A. Comparison of methods for the identification of coagulase negative Staphylococci. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 8, p. 855-860, 2004.
- DANIELSON, M.L.; HELLBERG, B. The biochemical activity of enterotoxic and non enterotoxic producing staphylococci. **Acta Vet. Scan.**, **18**: 266-273, 1977.
- 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.
- ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; FUSCO, V. et al. PCR – based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. **J. Applied Bacteriol.**, v. 6, p. 1090- 1096, 2004.
- FDA. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>. 2002.

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**, **43**: 927, 938, 2006.

Ficca, G.; Chauvel, M.; Moüy, D. Prevalence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Med.Maladies Infec.**, v.36 ,p. 207-212, 2006.

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

FUERST, R. Frobisher and Fuerst's microbiology in health and disease: food as vectors of microbial disease. In **Sanitation Food handling**. W. B. Saunders Company, p. 418-433, 1983.

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. **Int. J. Food. Microbiol.**, 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.

HALPIN-DOHNALEK, M.I. & MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods – a review. **J. Food Protect.**, p. 267-82, 1989.

HANASHIRO, A.; MORITA, M.; PAULA, T.S. et al. Microbiological quality of popular street food in São Paulo city, Brazil, *Resumos nos Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu, PR*, 2001.

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

HOLECKOVA, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M. et al. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Ann. Agric. Environ. Med.**, v. 9, p. 179-182, 2002.

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

HOWES, M.; MCEVEN, S.; GRIFFITHS, M.; HARRIS, L. Food handler certification by home study: Measuring changes in knowledge and behavior. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, **16**: 737-744, 1996.

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

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. **J. Clin. Microbiol.**, **37**, 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*. **J. Immunol.**, v. 166, p. 669- 677, 2001.

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, pp. 353- 357, 1997.

JOHNS, Jr M.B.; KHAN, S.A. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with a discrete genetic element. **J. Bacteriol.**, 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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 426-430, 1991

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. **Epidemiol. Infect.**, v. 113, p. 75-81, 1994.

KLOOS W. E & MUSSELWHITE M. S. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. **Appl. Microbiol**, v. 30, p. 381-95, 1975.

KLOOS W. E. & SCHLEIFER K. H. *Staphylococcus auricularis* sp. Nov.: an inhabitant of human external ear. **Int. J. Syst Bacteriol.**, v. 33, p. 9 –14, 1983.

KLOOS W. E. & BENNERMAN T. L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 7, p. 117-40, 1994.

- KOKAN, N.P. & BERGDOLL, M.S. Detection of low enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, p. 2675-2676, 1987.
- KURODA, M., et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v. 357, p. 1225–1240, 2001.
- KWOK A. Y. C. & CHOW A. W. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. **Int. Evol. Microbiol.**, 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-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 97, p. 137-145, 2004.
- LAMPS, L.W. Pathology of foodborne infectious disease of the gastrointestinal tract: an update. **Adv. Anat. Pathol.**, v. 10, n. 6, p. 319- 327, 2003.
- LANCETTE, G.A & BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. In: DOWNES F. P; ITO, K. (Eds). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington: **Apha**, p. 387-403, 2001.
- LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F. et al. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **J. Applied Microbiol.**, 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*. *J. Infect. Dis.*, 189: 2334- 2336, 2004.
- LOWBURY, E.J.L.; LILLY, H.A.; BULL, J.P. Disinfection of hands: removal of transient organisms. **B. Medical J.**, 2: 230-233, 1964.
- 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 . **Infect. Immun.**, 61: 4254-4262, 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. In. **J. Food Microbiol.**, 14: 119-126, 1991.

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. **Inter. J. Food Microbiol.**, v. 94, p. 279-286, 2004.

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

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1032-1035, 2000.

MEMPEL, M.; LINA, G.; HOJKA, M.; SCHOPP, C.; SEIDL, H.P.; SCHAFFER, T.; RING, J.; VANDENESCH, F.; ABECK, D. High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with eczema. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.22, p. 306-209, 2003.

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*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 3337- 3348, 1998.

MOSSEL, D.A.A.; VAN NELTEN, P. *Staphylococcus aureus* and related staphylococci in foods: ecology, proliferation, toxigenesis, control and monitoring. **J. Appl. Bacteriol Symp. Suppl.**, **69**: 123-145, 1990.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Pennsylvania; 2002: NCCLS document M100-S12

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.

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 Microbiol.** v. 98, p. 73-79, 2005.

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. **J. Clin. Microbiol.**, 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. **Infect. 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. **Infect. 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. **Infect. Immunity**, v. 71, p. 2916-2919, 2003.

PARVEEN, N.; KAMAL, M.M.; SAHA, S.; CHOUDHURY, K.A. Characterization and antibiogram of *Staphylococcus aureus* strains isolated from market meat and food handlers. **Indian J. of Animal Sciences**, v. 72, n. 2, p.195-196, 2002.

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*. **Infect. Immun.**, 70: 4987-96, 2002.

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 Microbiol.**, v. 28, p. 340-352, 2005.

POLLLEDO, J.J.F.; GARCIA, M.L.; MORENO, B. Phage typing, enterotoxin production and antibiotic resistance of *S. aureus* strains isolated from food handlers. **Archiv fur Lebensmittelhygiene**, 36(4):79-82, 1985.

- 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.
- REN, K.; BANNAN, J.D; PANCHOLI, V. et al. Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 1675-83, 1994.
- ROBBINS, R., GOULD, S., BERGDOLL, M., Detection the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Appl. Microbiol.**, v. 28, p. 946-50, 1974.
- ROSEC, J.P.; GIGAUD, O.; DALET, C.; RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci from foods in France. **Inter. J. Food Microbiol.**, v. 35, p. 213-221, 1997.
- ROSEC, J.P. & GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **Inter. J. Food Microbiol.**, v. 77, p. 61-70, 2002.
- SANTOS SANCHES, I.; RAMIREZ, M.; TRONI, H.; ABECASSIS, M.; PADUA, M.; TOMASZ, A.; DE LENCASTRE, H. Evidence for the geographic spread of a methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1243-1246, 1995.
- SCHABERG, D. R.; CULVER D. H.; GAYNE, R. P. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. **Am J. Mes.** V. 91, n. 3B, p. 72-75, 1991.
- 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*. **Int. J. Bacteriol.**, v. 25, p. 50-61, 1975.
- SHAFFER, W.M.; IANDOLO, J.J. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. **Infect. Immun.**, 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*. **J. Bacteriol.**, v. 129, p. 317- 325, 1977.
- 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.

- SOARES, M. J. S.; TOKUMARU-MIYAZAKI, N. H.; NOLETO, A. L. S.; FIGUEIREDO, M. S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of Brazilian epidemic MRSA clone (III: B: A) among isolates from food handlers. **J. Med. Microbiol.**, v. 46, p. 214-221, 1997.
- SORIANO, J.M.; JUAN, G.F.; MOLTO, C.; MANES, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. **Trends in Food Science and Technology**, **13**: 60-67, 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. **Rev. Méd. Chile**, **124**: 1142- 1146, 1996.
- STILES, B.G.S. & KRAKAUER, T. Staphylococcal enterotoxins: a purging experience in review, Part I. **Clin. Microbiol. Newsletter**, **27**(23): 179-185, 2005.
- SU, Y.C & WONG, A.C.L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. **J. Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 1438-43, 1995.
- 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.
- 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). **Infect. Immun**, v. 61, p. 356- 359, 1993.
- UDO, E.E.; AL-OBAID, I.A.; JACOB, L.E; CHUGH, T. D. Molecular characterization of epidemic ciprofloxacin and methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* strains colonizing patients in an intensive care unit. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 3242-3244, 1996.
- 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. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 819-823, 1999.

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

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

VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: Edward Brothers. 1219p, 1992.

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. **Int. J. Food microbial.**, v. 30, p. 271-280, 1996.

VON EIFF, C., BECKER K., MACHKA K., STAMMER H., PETERS G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. **N. Engl. J. Med**, v. 344, p. 11-6, 2001.

ZAR, JH. Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey, 718p, 1996.

ZAVADINACK NETO, M.; HERREIRO, F.; BANDEIRA C. O . P.; ITO, Y.; CIORLIN E.; SAQUETI, E. E.; ANSILIEIRO, J. E.; GONSALVES, L.; SIQUEIRA, V. L. D. *Staphylococcus aureus*: Incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 3, p. 709-712, 2001.

ZHANG, S. IANDOLO, J.J. STEWART, G.C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 168, p. 227- 233, 1998.

ANEXO

1. Tampão Lisozima

- 0,1 M NaCl
- 10 mM Tris (pH 8,0)
- 1 mM EDTA
- 5% Triton X- 100

A solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos e guardada em geladeira.

2. TBE (Tris- Borato- EDTA)

- 1 L de Solução estoque (5x)
 - 54 g Tris Base
 - 27,5 g ácido bórico
 - 20 mL EDTA 0,5 M (pH 8)
 - água bidestilada (p.s.q.)