

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROTOXINAS PRODUZIDAS POR LINHAGENS DE *Staphylococcus aureus* ENVOLVIDAS EM SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS NO PERÍODO DE 2002 A 2003, NO RIO GRANDE DO SUL.

Solange Mendes Longaray

PORTO ALEGRE
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROTOXINAS PRODUZIDAS POR LINHAGENS DE *Staphylococcus aureus* ENVOLVIDAS EM SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS NO PERÍODO DE 2002 A 2003, NO RIO GRANDE DO SUL.

Solange Mendes Longaray

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, na especialidade de Bacteriologia Aplicada.

Orientador: Dra. Marisa Ribeiro de I. Cardoso

PORTO ALEGRE
2007

L848i Longaray, Solange Mendes

Identificação de enterotoxinas produzidas por linhagens de *Staphylococcus aureus* envolvidas em surtos de doenças transmitidas por alimentos no período de 2002 a 2003, no Rio Grande do Sul / Solange Mendes Longaray - Porto Alegre: UFRGS, 2007.

48 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2007. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso, Orient.

1. *Staphylococcus aureus* 2. Enterotoxinas
3. Doenças transmitidas por alimentos (DTA)
I. Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema Orient. II. Título

CDD 616.07581

Catálogo na fonte preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Veterinária da UFRGS

Solange Mendes Longaray

Dissertação “Identificação de enterotoxinas produzidas por linhagens de *Staphylococcus aureus* envolvidas em surtos de doenças transmitidas por alimentos no período de 2002 a 2003, no Rio Grande do Sul”, aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovada em 04 de janeiro de 2007.

Aprovada por:

Comissão formada pelo professores

Prof^a. Dr^a. Marisa Ribeiro de I. Cardoso
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Eduardo César Tondo
Membro da Comissão

Prof^a. Dr^a. Verônica Schmidt
Membro da Comissão

Prof^a. Dr^a. Silvia Dias de Oliveira
Membro da Comissão

Ao Rovani, Carolina, Camila, Alice e ao meu pai Aldaci “in memoriam”.

AGRADECIMENTOS

Ao Rovani, meu marido, amigo, namorado e companheiro, pelo amor, paciência , apoio, e minhas filhas pela compreensão.

À amiga e companheira de trabalho Jane Both pelo apoio e colaboração.

A Prof^ª. Marisa Cardoso, pela confiança e orientação acadêmica.

Ao Dr^º. Ricardo Dias da FUNED/MG, pelo apoio e incentivo técnico.

À Direção do IPB-LACEN/RS e aos colegas da Divisão de Análise de Produtos, aos colegas do PREMEC, e em especial aos colegas da Seção de Água e Alimentos, pelo esforço de colocar à minha disposição a estrutura física necessária, além do apoio técnico e do incentivo oferecidos durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do CGVS/SMS, em especial as amigas Cíntia e Rosaura pelo apoio incondicional

RESUMO

O *Staphylococcus aureus* está freqüentemente envolvido em surtos de intoxicação alimentar. Geralmente esses surtos têm início abrupto, causando náusea e vômito nos acometidos. Na elucidação deste tipo de surtos é necessário que seja investigada a presença da enterotoxina no alimento e/ou a capacidade enterotoxigênica da bactéria isolada. A partir disso, o objetivo do presente estudo foi implantar uma técnica de detecção de enterotoxinas e avaliar a capacidade enterotoxigênica de linhagens de *Staphylococcus aureus* isolados de surtos. Trinta linhagens isoladas, no período de 2002 a 2003, de alimentos envolvidos em surtos no Rio Grande do Sul foram identificadas e avaliadas quanto à capacidade de produzir enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED, através da técnica de sensibilidade ótima em placa-OSP. Ao lado disso, os dados epidemiológicos relativos aos surtos de origem foram coletados. Os resultados obtidos demonstraram que todas as linhagens foram positivas no teste da catalase, coagulase em tubo, prova de termonuclease, teste de hemólise e fermentaram a maltose e o manitol, sendo confirmadas como *Staphylococcus aureus*. Todas as linhagens produziram enterotoxina SEA, 24 produziram SEB, 12 SEC e 6 SED, isoladamente ou em associação. A maioria das linhagens foi isolada de alimentos submetidos à grande manipulação durante seu preparo e apresentaram contagens superiores a 10^6 UFC/g de *Staphylococcus aureus*, demonstrando que condições favoráveis à produção de enterotoxinas devem ter ocorrido durante o seu preparo e armazenamento.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus often occurs in food poisoning outbreaks. These outbreaks usually start abruptly, causing nausea and vomit on affected people. In order to investigate these outbreaks, it is necessary to check the presence of enterotoxin in food and/or enterotoxigenic capacity of isolate. So the purpose of this study was to propose a method to the enterotoxin detection and evaluate the enterotoxigenic capacity of coagulase positive *Staphylococci* strains which were isolated from foods involved with outbreaks. On the period of 2002 to 2003, thirty strains detected in foods poisoning outbreaks in RS were identified and evaluated on their SEA, SEB, SEC and SED enterotoxins production capacity checking their sensitivity on OSP - plates. Moreover, epidemiological information related to the origin outbreaks was collected. The results showed that all the strains were positive according to following tests: catalase, coagulase in vitro/tube, termonuclease and hemolysis. Besides the strains have fermented maltose and manitol as to confirm as being *Staphylococcus aureus*. All the strains produced SEA enterotoxin; 24 of them produced SEB, 12 SEC and 6 SED, isolated or in association. Most strains were isolated in food that had been under intense manipulation during their preparation and which had presented levels higher than 10^6 CFU/g to *Staphylococcus aureus*, indicating that favorable conditions to the production of enterotoxins should have occurred during their preparation and storage.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variação das contagens e número de ocorrências de estafilococos coagulase positiva por grupo de alimentos.....	36
Tabela 2 – Resultado das enterotoxinas estafilocócicas por grupo de alimentos.....	38

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Dados epidemiológicos obtidos de surtos.....	33
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Molde para marcação dos orifícios nas placas de OSP.....	31
FIGURA 2 - Placa demonstrando reações positivas de OSP.....	32
FIGURA 3 - Distribuição das enterotoxinas produzidas por linhagens de <i>S. aureus</i> isoladas de surtos de DTA no RS, de acordo com o tipo (SEA, SEB, SEC e SED).....	37
FIGURA 4 - Distribuição da produção das enterotoxinas isoladas ou combinadas das 30 linhagens de <i>S. aureus</i> de DTA no RS.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APHA- American Public Health Association

ATCC- American Type Culture Collection

BHI- Caldo de Infusão Cérebro e Coração

CEVS- Centro Estadual de Vigilância em Saúde

CGLAB- Coordenação Geral de Laboratórios

CRS- Coordenadoria Geral de Saúde

DTA- Doença Transmitida por Alimentos

DVS- Divisão de Vigilância Sanitária

ET- Toxina Estafilocócica Esfoliativa

FIOCRUZ- Instituto Oswaldo Cruz

FUNED- Fundação Ezequiel Dias

IAL- Instituto Adolfo Lutz

IPB- Instituto de Pesquisas Biológicas

LACEN- Laboratório Central de Saúde Pública

MS- Ministério da Saúde

OSP- Optimum Sensitivity Plate

RDC- Resolução de Diretoria Colegiada

RIA- Radioimunoensaio

RLPA- Aglutinação Passiva Reversa em Látex

SE- Enterotoxina Estafilocócica

SES- Secretaria Estadual da Saúde

SSMA- Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente

SUS- Sistema Único de Saúde

SVS- Secretaria de Vigilância Sanitária

TSST- Toxina da Síndrome do Choque

UFC- Unidade Formadora de Colônias

VISA- Vigilância Sanitária

WHO- World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE QUADROS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	16
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.1.1 Caracterização do microrganismo.....	16
2.1.2 Principais doenças causadas por <i>Staphylococcus aureus</i>.....	17
2.1.3 Fontes de contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i>.....	17
2.2 Doença Transmitida por Alimento – DTA	18
2.3 Enterotoxina Estafilocócica – SE.....	21
2.4 Vigilância Sanitária e Epidemiológica	24
2.5 Legislação Sanitária para Alimentos.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Coleta das Amostras Bacterianas	27
3.2 Reativação das Amostras.....	27
3.3 Provas Bioquímicas.....	28
3.3.1 Teste de catalase	28
3.3.2 Prova de coagulase em tubo	28
3.3.3 Prova de termonuclease.....	28
3.3.4 Teste de hemólise.....	29
3.3.5 Teste de fermentação de manitol e maltose	29
3.3.6 Controle de qualidade das provas de identificação.....	29
3.4 Produção e Detecção de Enterotoxina Estafilocócica	29
3.4.1 Cultura em membrana sobre ágar	30

3.4.2 Detecção de enterotoxina pela técnica de OSP	30
3.4.3 Análise de dados	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXOS	48

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2000, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO), 2,1 milhões de óbitos decorrentes de doenças diarreicas foram registrados mundialmente, muitos deles atribuídos a alimentos e água contaminados. Nos EUA, 76 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) são relatados a cada ano, resultando em 325000 hospitalizações e 5000 óbitos (WHO, 2002).

No Brasil, de 1999 a 2005 foram notificados 4716 surtos de DTA, com 98018 pessoas acometidas e registro de 39 óbitos segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (BRASIL, 2006).

Segundo a série histórica da distribuição dos surtos investigados de DTA no Rio Grande do Sul, de 1987 a 2000, o número total de surtos foi de 1298, e, destes, 147 (11,3%) foram causados por *Staphylococcus aureus* (RIO GRANDE DO SUL, 2000). Entre 1999 e 2005, o estado do Rio Grande do Sul notificou 1275 surtos de DTA. Excluindo os surtos sem informação, 59,5% ocorreram em residências; 44,4% foram causados pelo consumo de ovos e produtos à base de ovos e 18% por alimentos de origem mista. *Salmonella* spp. foi detectada em 64,2% dos surtos, figurando o *S. aureus* em segundo lugar, sendo detectado em 11,7% dos surtos (BRASIL, 2006).

O *Staphylococcus aureus* é um patógeno freqüentemente envolvido em surtos de intoxicação alimentar. Geralmente, os surtos têm início abrupto e com sintomatologia intensa caracterizada por náuseas, vômitos e cólicas, prostração, pressão baixa e temperatura subnormal. Alterações na freqüência cardíaca podem também ser observadas. A recuperação ocorre em torno de dois dias, porém, alguns casos podem persistir por mais tempo ou exigir hospitalização. A morte é rara; contudo, pode ocorrer em crianças, idosos e indivíduos debilitados. O diagnóstico é fácil, especialmente quando há um grupo de casos, com predominância de sintomas gastrintestinais superiores e com intervalo curto entre a ingestão de um alimento comum e o início dos sintomas (KAMOGAE *et al.*, 1998).

A intoxicação alimentar por este microrganismo ocorre pela ingestão de enterotoxinas (SE) produzidas e liberadas pela bactéria durante a sua multiplicação no alimento (CUNHA NETO *et al.*, 2002). Segundo Forsythe (2002), as intoxicações alimentares estafilocócicas são causadas por enterotoxinas altamente termoestáveis,

resistentes à cocção ou à presença de enzimas proteolíticas do trato gastrintestinal, significando que é importante evitar a multiplicação do microrganismo nos alimentos.

No Brasil, a Coordenação Geral de Laboratórios (CGLAB) da Secretaria de Vigilância em Saúde/MS coordena a rede formada pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacen's) em todas as unidades federadas, as quais recebem e processam as amostras clínicas e bromatológicas dos casos e surtos de DTA. Os laboratórios de referência nacional, definidos pela CGLAB, recebem cepas e amostras que não podem ser completamente identificadas nos Lacen's, realizando exames específicos, como, por exemplo, sorotipificação de cepas e provas de identificação molecular. Para as DTA, os laboratórios de referência nacional e centros colaboradores são:

- Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz/RJ), para enterobactérias.
- Instituto Adolfo Lutz (IAL), para *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum*.
- Fundação Ezequiel Dias (Funed/MG), para *Staphylococcus aureus*.
- Universidade Federal do Rio de Janeiro, para *Streptococcus* spp. (SVS/MS/BRASIL, 2005).

As cepas de estafilococos coagulase positivas isoladas nos Lacen's são enviadas à Fundação Ezequiel Dias (Funed/MG), para a detecção e caracterização de enterotoxinas pela técnica de difusão dupla de sensibilidade ótima em placa (Optimum Sensitivity Plate – OSP), técnica esta padronizada pela Fundação.

Considerando os dados epidemiológicos e o alto custo para a saúde pública, a implantação de uma metodologia, no IPB-LACEN/RS, que identifique a presença de enterotoxinas produzidas por estafilococos isolados de alimentos envolvidos em surtos de DTA ocorridos no Rio Grande do Sul, servirá como ferramenta importante na elucidação mais eficaz destes episódios, e atenderá a recomendação da legislação RDC nº. 12 de 10/02/2001 ANVISA/MS. A partir disso, os resultados emitidos pelo IPB-LACEN/RS como apoio ao diagnóstico dos surtos de DTA causados por este agente bacteriano e suas enterotoxinas, podem ser aprimorados.

Como passo inicial no processo de implantação da técnica, o objetivo do presente estudo foi de padronizar a técnica e determinar a capacidade de linhagens de

Staphylococcus aureus isoladas de alimentos envolvidos em surtos de DTA no Laboratório Central do Estado - IPB-LACEN/RS, em produzir enterotoxinas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Caracterização do Microrganismo

Os estafilococos são bactérias Gram-positivas, imóveis, de forma esférica, medindo de 0,5 a 1,0 μ m, agrupada em massa irregular em forma de “cacho”. Apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, atuando sobre carboidratos com produção de ácidos, sendo aeróbias e anaeróbias facultativas (CUNHA NETO *et al.*, 2002).

O gênero *Staphylococcus* é composto por cerca de 27 espécies, sendo algumas freqüentemente associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, em humanos e animais. As principais espécies de estafilococos encontrados em humanos são os *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) e *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*). O *S. epidermidis* é encontrado primariamente como residente da pele, tendo um baixo potencial patogênico, assim como o *S. saprophyticus*, que faz parte da microbiota normal da pele e região periuretral do homem e da mulher. O *S. aureus*, patógeno em potencial, pode ser encontrado na região da nasofaringe e, também, nas fossas nasais e pele (TRABULSI, 1999).

Os estafilococos são divididos em dois grupos: coagulase positiva e coagulase negativa. Entre os coagulase positiva, o *S. aureus* representa a espécie geralmente envolvida em infecções humanas tanto de origem comunitária quanto hospitalar, enquanto o *Staphylococcus intermedius* está mais associado com infecções em caninos e equinos (TORTORA, 2000).

2.1.2 Principais Enfermidades Causadas por *Staphylococcus aureus*

As infecções por estafilococos podem ser didaticamente classificadas com base em dois mecanismos distintos: 1) processo infeccioso agudo; e 2) doenças causadas por toxinas. As infecções agudas podem ser localizadas, como pústulas, furúnculos, impetigos. Também podem constituir processos mais extensos e graves, como infecção pós-cirúrgica, osteomielite, pneumonia, endocardite, meningite, ou disseminadas, como bacteremia e septicemia. Doenças causadas por toxinas também apresentam amplo espectro de manifestações clínicas, como celulite, síndrome da pele escaldada, síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar (ARBUTHNOTT, COLEMAN & AZAVEDO, 1990; CORBELLA *et al.*, 1997 *apud* NOVAK, 1999).

2.1.3 Fontes de Contaminação por *Staphylococcus aureus*

Segundo Silva Júnior (2002), o humano pode infectar-se por contato direto com indivíduos doentes ou portadores, ou indiretamente, através da água, do solo, ar, fômites e alimentos. Nesta cadeia epidemiológica, o alimento é um carreador de microrganismos e, pode ser contaminado diretamente a partir das vias de eliminação do homem e dos animais. Os microrganismos, por sua vez, podem se manter em partículas de alimentos ou de água sobre utensílios lavados inadequadamente. Do ponto de vista sanitário, o uso de recipientes e utensílios contaminados representa um risco, particularmente quando se refere a alimentos cozidos que não se destinam ao consumo imediato.

Para Silva Junior (*op. cit.*), a razão para limpar e sanificar as superfícies que entram em contato com os alimentos e o ambiente, deve-se ao fato dessas operações auxiliarem o controle microbiológico, o que pode influir sobre a estabilidade e inocuidade do alimento, pois alguns surtos estão diretamente relacionados à falta de limpeza e desinfecção dos equipamentos e superfícies. Além disso, a contaminação cruzada pode estar associada à falta de higiene de equipamentos e utensílios de cozinha.

De acordo com Raddi (1988), os manipuladores de alimentos, que sejam portadores nasais de *S. aureus*, tocando alimentos com as mãos durante o trabalho, podem perpetuar a cadeia epidemiológica de intoxicação alimentar. Estudos epidemiológicos vêm sendo realizados na tentativa de estabelecer uma possível ligação entre portadores de *S. aureus*, a disseminação da bactéria e a perpetuação de linhagens resistentes, que se propagariam no ambiente familiar e de trabalho.

A detecção e controle de portadores de *S. aureus* assumem significativa importância quando se trata de profissionais da área de saúde e manipuladores de alimentos, principalmente devido à existência de linhagens produtoras de enterotoxinas (ANDRADE & ZELANTE, 1989; MESQUITA *et al.*, 2006).

2.2 Doença Transmitida por Alimento – DTA

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2001), DTA é uma síndrome originada pela ingestão de alimentos e/ou de água que contenham agentes etiológicos (biológicos, toxinas, físicos ou substâncias químicas) em quantidades tais que afetem a saúde do consumidor em nível individual ou grupo de população.

A toxinfecção alimentar não é uma enfermidade nova. Séculos atrás, as leis dos Israelitas continham informações detalhadas sobre os alimentos que podiam ser ingeridos e os que se devia recusar, assim como sobre os métodos de preparação e higienização das mãos dos consumidores. Aproximadamente no ano 2000aC, Moisés não somente ditou leis que protegiam seu povo dos agravos das enfermidades infecciosas, como também regras relativas à lavagem das mãos após os sacrifícios de animais e antes de fazer as refeições (BRASIL, 2005).

As enfermidades de origem alimentar ocorrem quando uma pessoa contrai uma doença devido à ingestão de alimentos contaminados com microrganismos ou toxinas indesejáveis. Essa condição é frequentemente, denominada de toxinfecção alimentar. Muitos casos de enfermidades causadas por alimentos não são notificados, pois seus sintomas são geralmente pouco expressivos e inespecíficos. Os sintomas mais comuns de

doença de origem alimentar incluem dor de estômago, náusea, vômito, diarreia e febre (FORSYTHE, 2002).

A determinação da origem das doenças alimentares é complexa. Ela pode estar relacionada a diversos fatores ligados à cadeia epidemiológica de enfermidades transmissíveis, que envolvem a tríade agente-meio ambiente-hospedeiros suscetíveis. Entre os fatores comumente associados às DTA, merecem destaque: as mudanças das características demográficas de certas regiões; o crescente aumento das populações; a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; o processo de urbanização desordenado; a necessidade de produção de alimentos em grande escala; a utilização de novas modalidades de produção; os hábitos culturais; a exposição das populações a alimentos do tipo "fast-food"; o consumo de alimentos em vias públicas; o aumento no uso de aditivos; e as mudanças de hábitos alimentares; sem deixar de considerar as mudanças ambientais, além do deficiente controle dos órgãos públicos e privados para manter a qualidade dos alimentos ofertados às populações (BRASIL, 2005).

Surtos de intoxicação alimentar são frequentemente relatados, sendo aqueles causados por *S. aureus* comuns, pois, havendo no alimento condições favoráveis à multiplicação, em poucas horas certas linhagens produzem toxinas termoestáveis que são responsáveis pelo quadro clínico (RADDI *et al.*, 1988; PINTO 1999).

Segundo Cunha Neto *et al.* (2002), a intoxicação alimentar provocada por *S. aureus* é devida à ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento, representando um risco para a saúde pública. A enterotoxina estafilocócica é termoestável, e está presente no alimento mesmo após o cozimento, possibilitando, desta forma, a instalação de um quadro de intoxicação de origem alimentar. Sendo o agente responsável por aproximadamente 45% das toxinfecções no mundo, vários trabalhos indicam os manipuladores de alimentos como os maiores responsáveis pela sua transmissão.

Atualmente, órgãos internacionais como, WHO (World Health Organization), ICMSF (International Committee on Microbiological Specification for Foods) e a APHA (American Public Health Association), recomendam padrões e métodos de análise microbiológica, tanto clínica como de alimentos, para a rotina laboratorial. Testes bioquímicos mínimos são adotados para diferenciação na área clínica de *S. aureus*,

S. epidermidis e *S. saprophyticus* e em análise de alimentos do *S. aureus* e *S. epidermidis*. No Brasil, para a identificação de *S. aureus* são recomendados os testes de produção de coagulase, termonuclease, coloração de Gram e catalase, permitindo diferenciar o *S. aureus* de *S. intermedius* e *S. hyicus*. Alguns autores relacionam alguns testes bioquímicos, como a produção de coagulase, termonuclease, hemólise e fermentação de manitol com a capacidade das cepas de *Staphylococcus* spp. e *S. aureus* em produzirem enterotoxinas. Estes são testes indiretos, úteis para detecção de linhagens potencialmente enterotoxigênicas, embora autores tenham verificado que características fisiológicas podem ou não diferenciar linhagens enterotoxigênicas das não enterotoxigênicas (CUNHA NETO *et al.*, 2002).

A intoxicação alimentar estafilocócica é caracterizada por náuseas, vômito, dores abdominais e diarreia, e por um curto período de incubação, de 30 minutos a 6 horas após a ingestão do alimento responsável. O período de incubação e a severidade dos sintomas dependem da quantidade de enterotoxina ingerida e da susceptibilidade do indivíduo. A remissão dos sintomas ocorre geralmente de forma espontânea após 24 horas (CUNHA NETO *et al.*, 2002).

Durante o período de 1988 a 1992, o *S. aureus* foi a causa de 5,1% das DTA na Europa. Dos 233 surtos ocorridos na Itália no mesmo período, quatro foram causadas por *S. aureus* (NORMANNO *et al.*, 2005). No País de Gales e Inglaterra, 54 surtos (1,9% do total de surtos) por *S. aureus* ocorreram entre 1983 e 1987. Nos Estados Unidos, no mesmo período, ocorreram 47 surtos (7,8% do total de notificações) (DE OLIVEIRA & HIROOKA, 1996). Observa-se que em países desenvolvidos as intoxicações estafilocócicas participam com baixa percentagem do total de surtos.

Entre 1999 e 2005, o estado do Rio Grande do Sul notificou 1275 surtos de DTA. Excluindo os surtos sem informação, 59,5% ocorreram em residências; 44,4% foram causados pelo consumo de ovos e produtos à base de ovos e 18% por alimentos de origem mista. *Salmonella* spp foi detectada em 64,2% dos surtos, figurando o *S. aureus* em segundo lugar como o causador de 11,7% dos surtos (BRASIL, 2006).

No período de 1995 a 2002, ocorreu no município de Porto Alegre, a notificação de 303 surtos de DTA, destes, 159 foram investigados e 99 foram confirmados pela identificação do agente e/ou alimento suspeito. Os principais agentes identificados nos

surtos foram *Salmonella* spp. (24%), o *S. aureus* em segundo lugar (12%) outros agentes também foram identificados como coliformes fecais, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Shigella* sp. (GOTTARDI *et al.*, 2006).

2.3 Enterotoxinas Estafilocócicas – SEs

Becker *et al.* (1998) descrevem os *S. aureus* como produtores de um ou mais de um grupo de exotoxinas específicas que incluem: as enterotoxinas estafilocócicas (SE), a toxina estafilocócica esfoliativa (ET) e toxina da síndrome do choque (TSST-1). Essas toxinas pertencem à família das toxinas pirogênicas, as quais apresentam algumas similaridades quanto à estrutura, função e seqüência de aminoácidos (BALABAN & RASOOLY (B), 2000). Apesar dessas similaridades, as toxinas pirogênicas estão envolvidas em diferentes patologias. As ET são responsáveis pela síndrome estafilocócica da pele escaldada, sendo conhecidas duas toxinas de sorotipos diferentes (A e B, a ETA e ETB, respectivamente). A TSST-1 é a exotoxina mais envolvida na síndrome estafilocócica do choque tóxico, especialmente associada com casos de infecção ocorridos durante o período menstrual.

Várias espécies do gênero *Staphylococcus* são apontadas como capazes de produzir SE (JAY, 1992). Entretanto, apenas o *S. intermedius*, além do *S. aureus*, já foi claramente associado a surtos de intoxicação alimentar (KHAMBATY *et al.*, 1994).

As SE que causam intoxicação alimentar estafilocócica são classificadas por um critério sorológico em grupos antigênicos, sendo que o número de tipos varia com a homologia de sua identificação. As SEA até E e a SEH foram claramente associadas a quadros clínicos característicos de atividade emética (LOIR *et al.*, 2003). As SEC podem ser subdividas em SEC₁, SEC₂ e SEC₃, devido a pequenas diferenças antigênicas (BECKER *et al.*, 1998).

Kamboj *et al.* (2006) descreveram que existem diferentes tipos de enterotoxinas (SE) divididas em A (SEA) até E (SEE) e G (SEG), H (SEH), R (SER) e U (SEU), entretanto somente algumas são capazes de causar intoxicação alimentar.

As enterotoxinas são polipeptídios de estrutura simples e similar, com peso molecular entre 27,5 a 30KDa, cuja percentagem de homologia na seqüência de aminoácidos varia entre 29 a 82% (DE OLIVEIRA & HIROOKA, 1996). São secretadas no meio onde a bactéria se encontra, sendo solúveis em água e soluções salinas. Sua estrutura é rica em lisina, ácido aspártico e tirosina. A maioria delas possui uma alça de cistina requerida para sua conformação apropriada e que está provavelmente envolvida em sua atividade emética. São altamente estáveis, resistem à maioria das enzimas proteolíticas, como pepsina e tripsina, portanto, mantêm atividade no trato digestivo após a ingestão (BERGDOLL, 1983).

As enterotoxinas são altamente resistentes ao calor principalmente quando estão associadas à matriz dos alimentos (BERGDOLL, 1983). A inativação parece variar de acordo com o tipo de matriz e o pH, porém é sempre bem inferior à curva de destruição da bactéria que a produziu (SCHWABE *et al.*, 1990).

Muitos dos genes que codificam as enterotoxinas podem encontrar-se em bacteriófagos moderados (BETLEY & MEKALANOS, 1985); plasmídeos (SHALITA *et al.*, 1977); ou no cromossomo (SHAFER & IANDOLO, 1978; FITZGERALD *et al.*, 2001). A regulação da expressão da toxina é feita por um gene acessório (*agr*) que age em combinação com o gene *sar* (KORNBLUM *et al.*, 1990; CHEUNG *et al.*, 1992). A expressão do gene *agr* está intimamente ligada ao número de bactérias na população, sendo que contagens elevadas (a partir de 10^6 UFC/g) têm um papel crucial na capacidade de produção das SE (NOVICK, 2000).

As enterotoxinas funcionam não só como potentes toxinas gastrintestinais, mas também como superantígenos, estimulando a proliferação de células T de forma não-específica, induzindo uma produção desordenada de citocinas. Estruturalmente, estas duas funções estão localizadas em dois domínios separados da proteína, tendo como alvo células distintas (BALABAN & RASOOLY (A), 2000).

As citocinas liberadas em resposta a esse estímulo, ligam-se a neuro-receptores do trato intestinal que estimulam o centro do vômito no cérebro, causando os sintomas característicos (KAMBOJ *et al.*, 2006). As enterotoxinas seriam mais corretamente classificadas como neurotoxinas, devido a esta forma de ação (AMARAL, 1997).

A dose capaz de causar sintomas é cerca de 0,1µg, sendo essa dose atingida no alimento quando a população de *S. aureus* excede 10⁶ UFC/g de alimento (EVENSON *et al.*, 1988).

A detecção de enterotoxinas estafilocócicas foi primeiramente realizada através de métodos biológicos, que consistiam na administração da toxina por via intragástrica a macacos. A partir da possibilidade de purificar, as técnicas de detecção fundamentaram-se no uso de anticorpos policlonais ou monoclonais específicos preparados contra as mesmas. Reações de precipitação em agarose foram desenvolvidas, destacando-se o ensaio de imunodifusão em microlâminas e, ainda, o ensaio da “Sensibilidade Ótima em Placa” (OSP), este último atingindo níveis de detecção da ordem de 0,5µg/g de enterotoxina, quando aliada à produção de toxina pelo método celofane sobre ágar (PEREIRA *et al.*, 2001). No teste OSP, apenas anticorpos policlonais podem ser utilizados, uma vez que os monoclonais não formam precipitado em géis de agarose. O nível de detecção dessa metodologia pode ser considerada adequada para a análise de enterotoxigenicidade de linhagens de *S. aureus* (DE OLIVEIRA & HIROOKA, 1996).

Tendo em vista que a análise de controle de qualidade dos alimentos requer monitoramento da presença de toxinas, então a detecção direta de enterotoxinas nos alimentos necessita métodos mais sensíveis, sendo que a quantidade de toxina em alimentos envolvidos em surtos pode ser de até 1 ng/g (BERGDOLL, 1990).

Um dos primeiros métodos que permitiu um incremento na sensibilidade foi a Aglutinação Passiva Reversa em Látex (RPLA), embora possam ocorrer reações inespecíficas com certos componentes alimentares, este método é capaz de detectar enterotoxinas na concentração de 0,75 ng/mL (DE OLIVEIRA & HIROOKA, 1996). Após, o radioimunoensaio (RIA) também foi proposto, apresentando uma sensibilidade de 1ng/g, porém exigindo o emprego de material radioativo para sua execução (BERGDOLL & REISER, 1980). Finalmente, a introdução de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) permitiu atingir uma sensibilidade de 0,1 a 1 ng/g de alimento. Esses testes constituem a base da maioria dos testes comerciais disponíveis. A maioria deles são ELISA do tipo sanduíche, onde placas impregnadas com anticorpos monoclonais contra diferentes enterotoxinas são expostas aos extratos dos alimentos ou sobrenadante de culturas. Finalmente, conjugados (peroxidase, avidina-biotina ou fosfatase alcalina) são acrescentados

ao sistema para permitir a visualização da reação (BERGDOLL, 1990). Atualmente, vários desses sistemas são totalmente automatizados, como por exemplo o VIDAS™ (VERNOSY- ROZAND *et al.*, 2004).

Uma outra forma de detectar linhagens enterotoxigênicas é a amplificação dos genes das diferentes enterotoxinas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Nesse caso, a detecção não depende da capacidade de expressão do gene nem é influenciada pela quantidade de toxina produzida (JOHNSON *et al.*, 1991). Entretanto, um resultado positivo na PCR é apenas indicativo do potencial de produção da enterotoxina, não sendo prova inequívoca da presença da toxina no alimento, uma vez que muitos dos genes presentes em linhagens de *S. aureus* não resultam em produção detectável de toxina (LOIR *et al.*, 2003).

Mais recentemente, a aplicação da PCR em tempo real na detecção de linhagens enterotoxigênicas permitiu a análise de um elevado número de amostras de forma mais rápida e eficiente tendo sido ainda, associada à detecção de outros genes relevantes para a patogenia de *S. aureus* (KLOTZ *et al.*, 2003).

2.4 Vigilância Sanitária e Epidemiológica

A Lei 8080/90 (BRASIL, 1990), ao organizar o Sistema Único de Saúde (SUS), define por Vigilância Sanitária um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde. Esta definição denota a abrangência das ações de Vigilância Sanitária (VISA) e sua natureza essencialmente preventiva, contendo especificidades que a diferenciam de outras ações e serviços de saúde devido ao vínculo estreito com os setores econômico, jurídico, público e privado e com a organização econômica da sociedade e seu desenvolvimento tecnológico e científico. Essas abrangem um amplo espectro dos elementos determinantes do processo saúde-doença-qualidade de vida e que podem ser entendidos como riscos ou problemas/necessidades de saúde relacionadas à produção, circulação e consumo de bens e serviços. Esta lei define ainda, como Vigilância Epidemiológica, um conjunto de ações que

proporciona o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças ou agravos. A Vigilância Epidemiológica disponibiliza informações atualizadas sobre a ocorrência de doenças e agravos, bem como dos seus fatores condicionantes em uma área geográfica ou população determinada para a execução de ações de controle e prevenção, além disso, é um instrumento importante para o planejamento, a organização e a operacionalização dos serviços de saúde, como também para a normalização de atividades técnicas correlatas. Sua operacionalização compreende um conjunto de funções específicas e complementares que devem ser, necessariamente, desenvolvidas de modo contínuo, permitindo conhecer, a cada momento, o comportamento epidemiológico da doença ou agravo em questão, deste modo, estarão sendo implementadas ações de intervenção pertinentes e eficazes (RIO GRANDE DO SUL, 2006).

2.5 Legislação Sanitária para Alimentos

Segundo Ministério da Saúde através da RDC nº12/2001 ANVISA, a “DTA” – é causada pela ingestão de um alimento contaminado por um agente infeccioso específico, ou pela toxina por ele produzida, por meio da transmissão desse agente, ou de seu produto tóxico. Quando necessário para a elucidação de DTA no rastreamento de microrganismos patogênicos ou toxinas, os resultados devem especificar o número de células viáveis do microrganismo agente da doença, e a amostra deve vir acompanhada de relatório adicional com informações que permitam direcionar a determinação analítica pertinente. Os valores estabelecidos para os padrões microbiológicos de cada grupo de alimento constantes no Anexo I da Resolução não se aplicam para o diagnóstico de caso/surto de DTA. A enumeração de estafilococos coagulase positiva tem por objetivo substituir a determinação de *Staphylococcus aureus*. Este critério consta como "Estaf. coag. positiva" no Anexo I da Resolução. A determinação da capacidade de produção de termonuclease e, quando

necessário, a de toxina estafilocócica dos isoladas podem ser realizadas a fim de obter dados de interesse à saúde pública (BRASIL, 2001).

A investigação epidemiológica de surto de DTA é de responsabilidade do órgão municipal de saúde. O município que não dispõe de condições para promover a investigação epidemiológica de surto de DTA deve comunicar o fato à Secretaria de Estado da Saúde (SES), que o apoiará na consecução da ação de investigação. Da mesma forma, compete à Secretaria de Vigilância em Saúde o apoio às SES, particularmente em surtos de grande magnitude ou complexidade (BRASIL, 2005).

No Brasil em 2001, foi iniciada a estruturação da vigilância epidemiológica a partir da vigilância da síndrome hemolítica urêmica, causada pela *Escherichia coli* O157:H7, com a realização de capacitações em vigilância epidemiológica para técnicos das Secretarias de Estado da Saúde do Ceará, do Distrito Federal, do Paraná, de São Paulo, do Rio Grande do Sul e de Minas Gerais (áreas de demonstração); e em diagnóstico laboratorial, para toda Rede Nacional de Laboratórios Centrais de Saúde Pública (BRASIL, 2001).

Nessa estrutura, a Coordenação Geral de Laboratórios (CGLAB) da Secretaria de Vigilância em Saúde/MS coordena a rede formada pelos Lacen's em todas as unidades federadas, as quais recebem e processam as amostras clínicas e bromatológicas dos casos e surtos de DTA, e exercem um papel fundamental nas investigações. Por sua vez, laboratórios de referência nacional, definidos pela CGLAB, recebem cepas e amostras que não podem ser completamente identificadas nos Lacen's, que realizam os exames específicos, como, por exemplo, sorotipificação de cepas e provas de identificação molecular.

Desta forma, estabeleceu-se o fluxo das rotinas para os Laboratórios Centrais de Saúde Pública do país, na ocorrência de DTA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das Amostras Bacterianas

Foram utilizadas, no presente estudo, 30 linhagens de estafilococos coagulase positiva isoladas, no período de 2002 a 2003, a partir de alimentos envolvidos em DTAS no Rio Grande do Sul, Brasil. Foram colhidas informações epidemiológicas de cada surto sobre o número de registro de entrada do alimento, data da ingestão do alimento, número da Coordenadoria Regional do Estado – CRS, município de origem do alimento, tipo de alimento, número de doentes e contagem de estafilococos coagulase positiva . As amostras foram mantidas congeladas (-20°C) em caldo de infusão cérebro e coração (BHI) e glicerol (na concentração de duas partes de amostra e uma parte do glicerol), no Laboratório Central de Saúde Pública IPB-LACEN/RS.

3.2 Reativação das Amostras

Para reativação bacteriana, a quantia de 0,2 mL foi retirada, a partir das amostras congeladas (-20°C), semeada em 5mL de caldo BHI (MERCK®) e incubada a 35°C por 24 h. Alíquotas do caldo foram semeadas em Ágar Baird Parker (MERCK®), e incubadas por 48 h a 35°C. Foram selecionadas três colônias características de estafilococos: com coloração negra brilhante, forma arredondada, convexa, com bordos regulares, circundadas por um halo branco e outro externo, maior e transparente. As colônias foram semeadas em caldo BHI e incubadas por 24 h a 35°C e submetidas às provas bioquímicas para identificação do gênero *Staphylococcus*.

3.3 Provas Bioquímicas

3.3.1 Teste de Catalase

A partir dos tubos de caldo BHI com crescimento transferiu-se 1,0 mL para tubos de ensaio e acrescentou-se 1,0 mL de Peróxido de Hidrogênio a 3%. A ocorrência de borbulhamento imediato foi considerado teste positivo.

3.3.2 Prova de Coagulase em Tubo

A partir dos tubos de caldo BHI com crescimento pipetou-se 0,1 mL para tubos de ensaio contendo 0,5 mL de plasma de coelho (Laborclin®), incubando-os a 35°C por um período máximo de 24 h. Após incubação, as culturas com nítida formação de coágulo são consideradas positivas.

3.3.3 Prova de Termonuclease – Tnase

A partir dos tubos de caldo BHI com crescimento, pipetou-se 1,0 mL para tubos de ensaio, que foram incubados à 100°C, por 15min sendo resfriados imediatamente (choque térmico). Inoculou-se a cultura fervida em orifícios previamente preparados em lâminas contendo Ágar Azul de Toluidina DNA. Incubou-se as lâminas à 35°C por 4 h em câmara úmida. Após a incubação, procedeu-se a leitura dos resultados, onde as culturas com nítida formação de um halo róseo estendendo-se por cerca de 1 mm das perfurações inoculadas foram consideradas positivas.

3.3.4 Teste de Hemólise

A partir dos tubos de caldo BHI com crescimento semeou-se uma placa de Ágar Sangue de Carneiro (Laborclin®), posteriormente incubada por 24 h a 35°C, e observou-se a formação de halo de hemólise ao redor das colônias (teste positivo).

3.3.5 Teste de Fermentação de Manitol e Maltose

A partir dos tubos de caldo BHI com crescimento semeou-se Ágar Manitol e Ágar Maltose (ANEXO A), ambos incubados por 24 h a 35°C. A mudança do indicador de púrpura para amarelo, evidenciando a mudança do pH indicou a fermentação dos referidos carboidratos.

3.3.6 Controle de Qualidade das Provas de Identificação

Para todas as provas de identificação bioquímicas realizadas foi utilizado como controle positivo o *Staphylococcus aureus* ATCC 25933. Todas as provas bioquímicas foram realizadas conforme ABNT (1991), Do Carmo (1998) e SILVA *et al.* (1997).

3.4 Produção e Detecção de Enterotoxina A, B, C e D

Confirmada a pureza, as linhagens foram novamente semeadas em Ágar Baird-Parker. Após, uma colônia foi colocada em 3 mL de caldo BHI, incubado por 24 h a 35°C.

3.4.1 Cultura em Membrana Sobre Agar

Para a extração das toxinas, foi empregado o método da membrana sobre ágar (ROBBINS *et al.*, 1974), utilizando-se de placas de Petri de 100 mm com 20 mL de ágar BHI, recobertas com disco de membrana de celofane. Um inóculo de 0,1 mL da cultura em caldo BHI foi espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalski sobre a superfície da membrana, sendo as placas incubadas a 35°C por 24h. Os cultivos obtidos foram lavados com 2,5 mL de tampão PBS (Na₂HPO₄ – 0,02M- pH 7,4) em duas etapas. A primeira, utilizando 1,5 mL e a segunda, logo após a primeira, 1,0 mL do tampão PBS. Os lavados das culturas foram centrifugados a 10.000 × g por 10 min a 4°C e os sobrenadantes utilizados para verificação da produção de enterotoxinas, por meio da Técnica de Sensibilidade Ótima em Placa – OSP (DO CARMO, 1998).

3.4.2 Detecção de Enterotoxina A, B, C e D por Técnica de Sensibilidade Ótima em Placa – OSP

Foram preparadas placas de Petri de 50 x 12 mm, com 3 mL de Agar Noble 1,2% (DIFCO®) em tampão PBS 0,02M (pH 7,4) acrescido de timerosal (1:1000). Após solidificado, foi demarcado, com o auxílio de molde (Figura 1) com 5 orifícios de 8,3 mm e 2 furos medindo 6,7 mm, os locais onde foram feitos os orifícios para inoculação. Nos dois orifícios menores foram inoculado (1 e 4) 4µg/mL de uma toxina-padrão e, no orifício central (7), o anti-soro específico de título conhecido; os orifícios restantes (2, 3, 5 e 6) foram preenchidos com o sobrenadante das amostras em teste, pura e diluída 1:2, de modo que este não ultrapassasse a borda do orifício. As placas foram incubadas em câmara úmida por 24 h a 35°C. Utilizou-se as toxinas-padrão e os anti-soros específicos para as enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC e SED. As reações positivas foram determinadas pela visualização da formação de linhas de precipitação entre a toxina (dos

sobrenadantes das culturas-teste) com a antitoxina-padrão de acordo com a orientação da Figura 2.

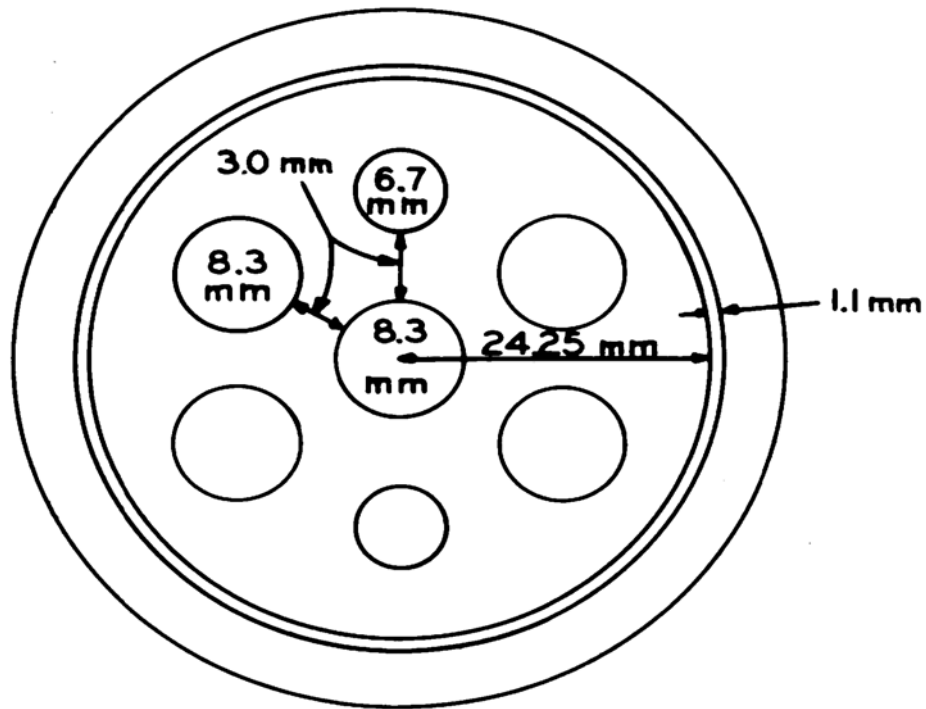


Figura 1: Molde para marcação dos orifícios nas placas de ágar Noble para Técnica de Sensibilidade Ótima em Placa (OSP)

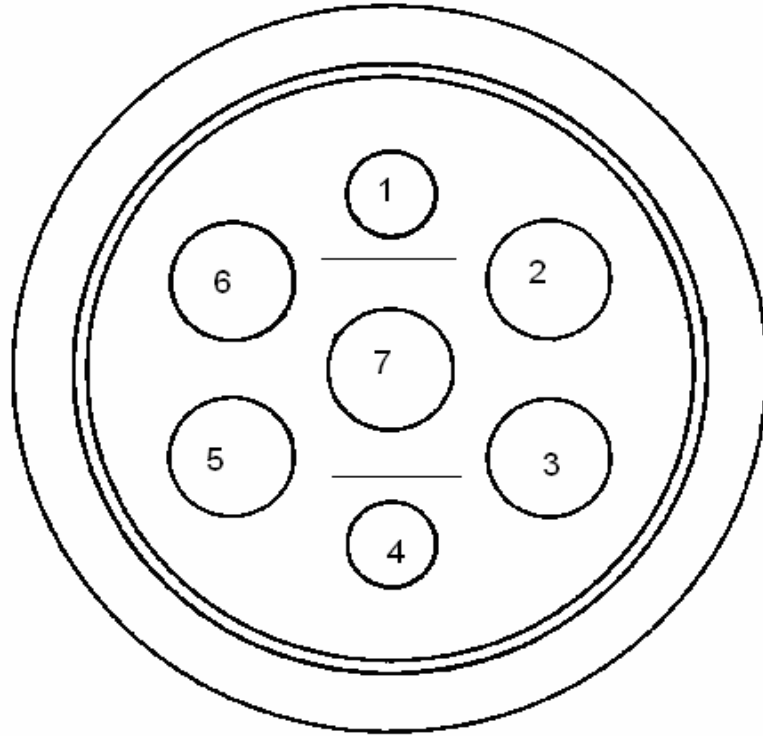


Figura 2: Placa demonstrando reações positivas determinadas pela visualização da formação de linhas de precipitação entre a toxina-padrão (1 e 4) com a antitoxina-padrão (7).

3.4.3 Análise de Dados

Os dados referem-se aos surtos e as enterotoxinas identificadas foram analisadas quanto à frequência relativa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de agosto de 2002 e dezembro de 2003 ocorreram, no estado do Rio Grande do Sul, 20 surtos em que a investigação epidemiológica juntamente com a análise microbiológica concluíram que se tratavam de intoxicações alimentares por estafilococos coagulase positiva.

Os dados epidemiológicos obtidos (Quadro 1) demonstraram que os surtos apresentaram entre 2 e 700 envolvidos e entre 2 e 150 indivíduos acometidos. A maioria dos surtos (n =11) apresentou até 10 indivíduos doentes, enquanto apenas dois surtos acometeram mais de 100 pessoas. Os alimentos do referido quadro foram posteriormente agrupados conforme estabelecido na RDC nº12/2001 ANVISA.

QUADRO 1 – Dados epidemiológicos obtidos de surtos atribuídos à intoxicação alimentar por estafilococos coagulase positiva no Rio Grande do Sul, entre agosto de 2002 e dezembro 2003.

Nº RG IPB/LACEN	Data do início dos sintomas	CRS	Município de origem	Tipo de alimento	Envolvidos (n)	Doentes (n)
3190/02	18.08.02	4ª	Santa Maria	bolo caseiro	50	6
3457/02	29.08.02	5ª	Caxias do Sul	polenta	17	2
3461/02	29.08.02	5ª	Caxias do Sul	torta folhada	17	2
3464/02	29.08.02	5ª	Caxias do Sul	creme de morango	17	2
3605/02	06.09.02	6ª	Não-Me- Toque	queijo colonial	4	4
4055/02	12.10.02	5ª	Nova Prata	churrasco de gado galeto e porco	112	106
4056/02	12.10.02	5ª	Nova Prata	maionese	112	106
4140/02	15.10.02	2ª	Taquara	carne moída	5	5
4264/02	20.10.02	6ª	Mormaço	bolo caseiro	500	48
5464/03	27.12.02	5ª	Bento Gonçalves	maionese com batata	11	9
5470/03	30.12.02	2ª	Barão do Triunfo	queijo	11	5
0933/03	09.03.03	10ª	Santana do Livramento	bolo	200	58
1243/03	28.03.03	15ª	Palmeira das Missões	lasanha	2	2

Nº RG IPB/LACEN	Data do início dos sintomas	CRS	Município de origem	Tipo de alimento	Envolvidos (n)	Doentes (n)
2095/03	22.05.03	1ª	Viamão	arroz com carne	6	5
2097/03	22.05.03	1ª	Viamão	polenta com carne	6	5
3087/03	14.07.03	1ª	Esteio	leite integral	3	3
3322/03	27.07.03	1ª	Porto Alegre	molho branco	3	3
3324/03	27.07.03	1ª	Porto Alegre	filé à parmegiana	3	3
4164/03	06.09.03	1ª	Canoas	bolo	50	30
4669/03	28.09.03	1ª	Porto Alegre	salada de fruta com creme de leite	2	2
4799/03	05.10.03	9ª	Ibirubá	carne moída	700	31
4800/03	05.10.03	9ª	Ibirubá	carne de churrasco	700	31
4898/03	15.10.03	5ª	Caxias do Sul	pão de queijo	-	-
6083/03	29.11.03	5ª	Vila Flores	salada de maionese	350	75
6169/03	28.11.03	12ª	Eugênio Castro	maionese	70	47
6174/03	04.12.03	10ª	Uruguaiana	bolo de chocolate	69	29
6175/03	04.12.03	10ª	Uruguaiana	arroz	69	29
6229/03	07.12.03	5ª	Veranópolis	carne bovina	700	150
6233/03	07.12.03	5ª	Veranópolis	salada de maionese	700	150
6266/03	08.12.03	3ª	Pelotas	queijo colonial	3	3

CRS: Coordenadoria Regional de Saúde

(-) – sem dados do número de envolvidos e doentes

Em sete surtos, vários alimentos ingeridos foram positivos para presença de estafilococos coagulase positiva, indicando a possibilidade de contaminação cruzada durante o preparo por contato entre diferentes alimentos, com superfícies contaminadas ou com as mãos de manipuladores. Essas práticas, associadas com armazenamento prolongado dos alimentos em temperaturas inadequadas, constituem os principais fatores de risco para ocorrência de surtos de intoxicação por *S. aureus* (FORSYTHE, 2002).

Os alimentos mais freqüentemente implicados nos surtos foram os pratos prontos para consumo seguido dos produtos de confeitaria, caracterizando-se, em ambos os casos, pela grande manipulação necessária durante o preparo e pela ausência de tratamento térmico imediatamente antes do consumo.

Alimentos envolvidos em surto de intoxicação estafilocócica podem variar entre países. No Reino Unido, por exemplo, 53% dos surtos por *S. aureus* notificados foram relacionados com o consumo de produtos cárneos, especialmente presuntos (WIENEKE *et al.*, 1993). Já na França, produtos lácteos, especialmente queijos foram responsáveis por 32% dos casos entre 1999 e 2000 (HAEGLEBAER *et al.*, 2002). Essas diferenças podem estar associadas com os hábitos alimentares em cada um dos países, ou seja, com a frequência com que determinados alimentos são consumidos.

No Rio Grande do Sul, dados históricos demonstram que os surtos estão relacionados mais frequentemente com os pratos prontos para consumo tanto com os ingredientes cárneos como os lácteos, sendo a origem dos ingredientes e os erros de manipulação os principais fatores envolvidos nos surtos (RIO GRANDE DO SUL, 2000).

Entre as falhas de preparo, a permanência do alimento em temperatura de risco ($>10^{\circ}\text{C}$ e $<60^{\circ}\text{C}$) contribui para que haja a multiplicação de bactérias presentes nos alimentos (JAY, 2005; FORSYTHE, 2002). Esse fato pode ser constatado nos surtos investigados, onde as contagens de estafilococos coagulase positiva estiveram acima de $3,0 \times 10^6$ UFC/g de alimento (14 em 30 amostras), estando, portanto, dentro da população considerada capaz de produzir toxina (LOIR *et al.*, 2003). Ao lado disto, contagens elevadas indicam que os alimentos foram armazenados sob condições que permitiram a multiplicação da bactéria no alimento (TABELA 1). Os alimentos da tabela foram agrupados conforme estabelecido na RDC n°12/2001 ANVISA.

Tabela 1 – Variação das contagens e número de ocorrências de estafilococos coagulase positiva por grupo de alimentos.

Grupo de Alimentos	Número de Isolados	Contagem UFC/g de estafilococos coagulase positiva (número de ocorrências)
Pratos prontos para consumo	16	>3,0 x 10 ⁶ (5); 5,4 x 10 ⁴ (1); 2,3x10 ⁴ (1); 1,0x10 ⁴ (2) 2,3x10 ³ (2); 9,4 x 10 ³ (1); 4,0 x 10 ³ (1); 1,3 x 10 ³ (1); 4,0 x 10 ² (1); 3,0x10 ² (1)
Produtos de confeitaria	7	>3,0x10 ⁶ (6); 2,6x10 ⁴ (1);
Produtos lácteos	4	>3,0x10 ⁶ (2); 3,2x10 ⁴ (1); 1,1x10 ³ (1)
Produtos cárneos	3	>3,0x10 ⁶ (1); 2,7x10 ³ (1); 1,3x10 ³ (1)

Todas as linhagens isoladas de alimentos envolvidos nos surtos foram positivas nos teste de catalase, coagulase em tubo, prova de termonuclease, hemólise e fermentaram maltose e manitol, sendo confirmadas como *Staphylococcus aureus*. Esses resultados estão de acordo com outros relatos que apontam o *S. aureus* como o mais isolado em alimentos dentro do grupo dos estafilococos coagulase positiva (JAY, 2002 ; FORSYTE, 2002). O *S. intermedius*, segundo mais freqüentemente relatado e também capaz de produzir enterotoxinas (BECKER *et al.*, 2001), pode ser diferenciado do *S. aureus* pela incapacidade de fermentar a maltose (DO CARMO, 1998).

Todas as linhagens isoladas de *S. aureus* demonstraram capacidade de produzir enterotoxinas. Entre as enterotoxinas pesquisadas, a SEA foi detectada em todas as linhagens de *S. aureus*, seguida pela SEB encontrada em 24 isolados (Figura 3). Ainda, a maioria dos isolados produziram mais de um tipo de enterotoxina concomitantemente, sendo a associação SEA/SEB a mais freqüente (11 isolados) seguida da associação SEA/SEB/SEC (9 isolados) (Figura 4).

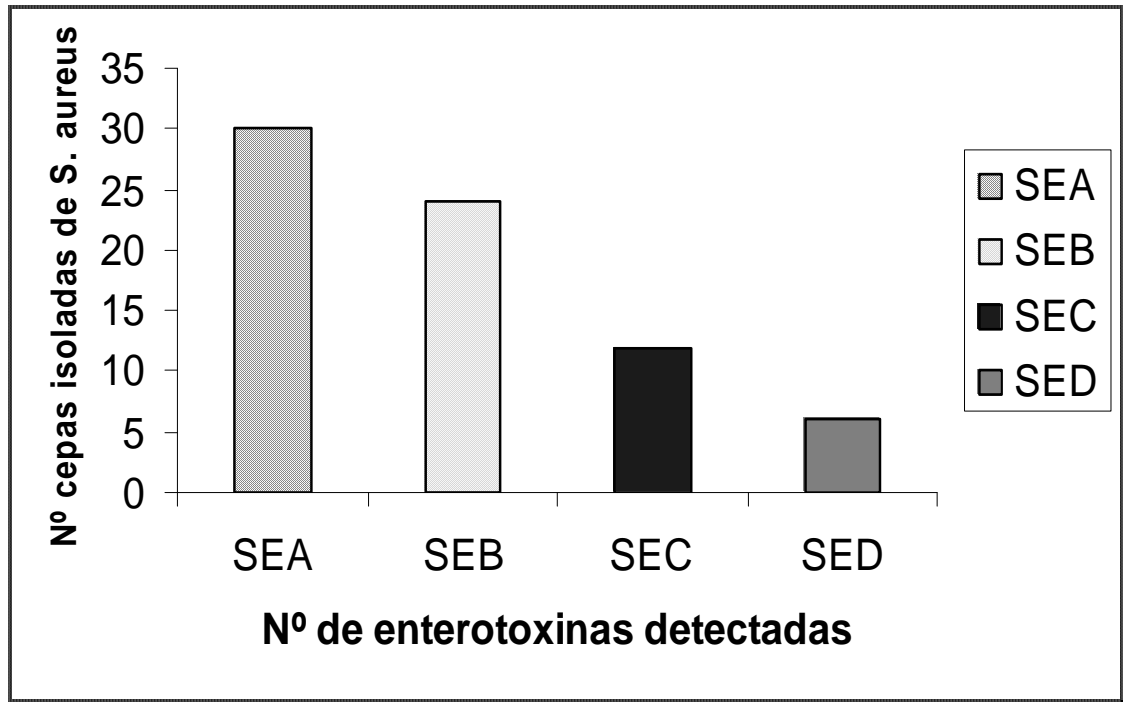


Figura 3 – Distribuição das enterotoxinas produzidas por linhagens de *S. aureus* isoladas de surtos de DTA no RS, de acordo com o tipo (SEA, SEB, SEC e SED).

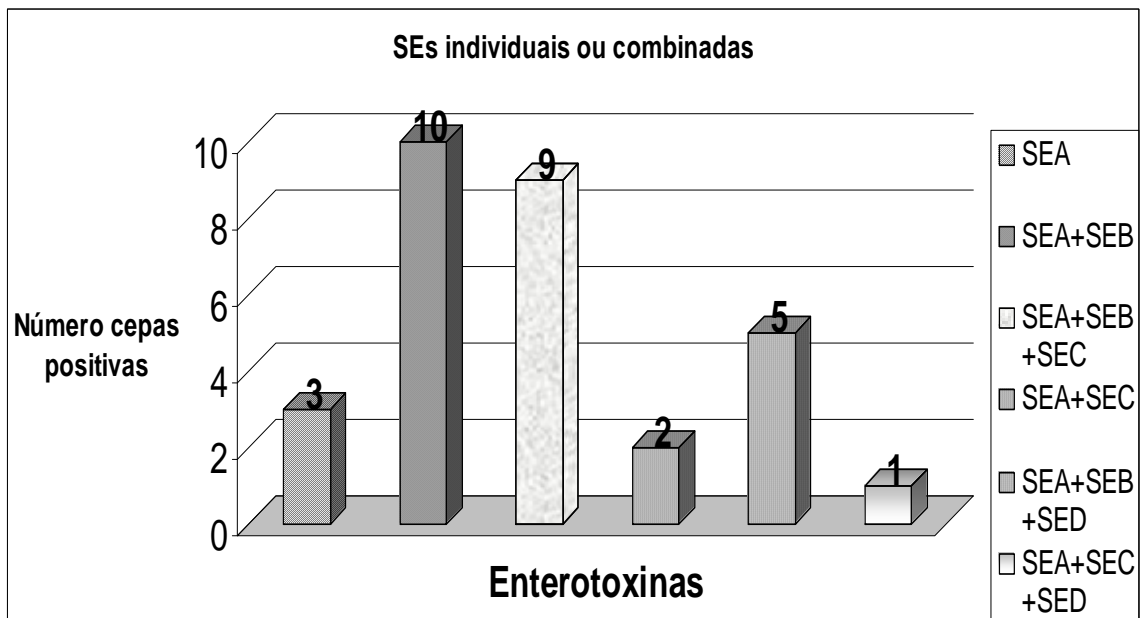


Figura 4 – Distribuição da produção das enterotoxinas isoladas ou combinadas das 30 linhagens de *S. aureus* de DTA no RS.

Em todos os tipos de alimentos envolvidos nos surtos foi possível identificar a presença da SEA, sozinha ou associada a outras enterotoxinas (Tabela 2). Esse resultado está de acordo com as afirmações de que a SEA é a mais implicada mundialmente nas intoxicações alimentares estafilocócicas (BALABAN & RASOOLY (A) , 2000).

Tabela 2 – Resultado das SE por grupo de alimentos.

Grupo de Alimentos	SEA	SEA +SEB	SEA +SEC	SEA +SEB +SEC	SEA +SEB +SED	SEA +SEC +SED
Pratos prontos para consumo	2	8	0	4	1	1
Produtos de confeitaria	0	0	0	3	4	0
Produtos lácteos	1	3	0	0	0	0
Produtos cárneos	0	0	1	2	0	0

Da mesma forma, outras investigações feitas em surtos de intoxicação alimentar no Brasil, estafilococos produtores de SEA estiveram sempre presentes (PEREIRA *et al.*, 1996; SABIONI *et al.*1988; CARMO *et al.*, 2003). Uma possível razão para essa predominância é a alta prevalência de *S. aureus* de origem humana entre os produtores de SEA (LOIR *et al.*, 2003). Dessa forma, contaminações dos alimentos a partir de manipuladores que sejam portadores de *S. aureus* produtores de enterotoxinas, potencialmente, poderão conter SEA e estarem envolvidos em surtos.

Por outro lado, linhagens de *S. aureus* de origem bovina parecem produzir mais freqüentemente SEC (AARESTRUP *et al.*, 1995), apesar de no Brasil o predomínio de linhagens produtoras de SED haver sido reportado (CARDOSO *et al.*, 1999; CARDOSO *et al.*, 2000). A constatação de que linhagens de *S. aureus* isolados de leite bovino e produtos lácteos são produtoras de enterotoxina tem relevância para a saúde pública (CARDOSO *et al.*, 2000) e pode justificar a presença de linhagens produtoras destes tipos de SE envolvidas em surtos. Entretanto, no presente estudo, linhagens produtoras de SEC e SED não estiveram relacionadas com os produtos lácteos envolvidos nos surtos, apesar de

haverem sido encontradas em produtos de confeitaria e pratos prontos que incluem esse tipo de ingredientes no seu preparo.

O perfil de enterotoxinas produzidas por linhagens envolvidas em surtos pode ser utilizado como ferramenta para identificar a origem de contaminação dos alimentos implicados. Carmo *et al.* (2003) ao investigarem um surto ocorrido na cidade de Passos (MG) compararam o perfil de enterotoxinas produzidas pela linhagem de *S. aureus* isolada do alimento implicado (panqueca de frango) e dos cinco manipuladores que haviam preparado a refeição. Nessa investigação, as linhagens isoladas do alimento produziram SEA, SEB e SED, sendo o mesmo perfil encontrado em três dos manipuladores de alimento. Esse tipo de resultado reforça a importância do treinamento dos manipuladores nas boas práticas de fabricação de alimentos e demonstra a importância da colheita de amostras de manipuladores envolvidos em surtos.

A epidemiologia dos surtos que têm como agente causal o *S. aureus* está relacionada à presença da toxina nos alimentos envolvidos. Dessa forma, a pesquisa da enterotoxina no alimento contribuiria para a elucidação dos surtos. Entretanto, a pesquisa de enterotoxinas requer métodos imunológicos com limite de detecção entre 1 e 2 ng/g de alimento, os quais demandam elevada purificação de antígenos e anticorpos resultando em elevado custo de produção (KAMOGAE *et al.*, 1998). Testes comerciais estão disponíveis, porém o custo elevado limita a disseminação de seu uso no controle de qualidade e, principalmente, pelo Sistema Público de Vigilância em Saúde. Como alternativa, é possível conduzir a pesquisa da capacidade de produção de enterotoxinas por linhagens de estafilococos isolados de alimentos implicados em surtos. Essa informação, associada às contagens elevadas do microrganismo no alimento, permitem inferir sobre o risco da presença da toxina no alimento e concluir sobre a etiologia do surto.

A técnica de imunodifusão dupla em placas de ótima sensibilidade (OSP) aliada à produção de enterotoxina pelo método do celofane sobre ágar atinge sensibilidade de 0,5 µg/mL, adequada para análise de enterotoxigenicidade da maioria das linhagens de *Staphylococcus* sp. (DE OLIVEIRA & HIROOKA, 1996). A metodologia de OSP foi padronizada pela Fundação Ezequiel Dias – FUNED/MG para implantação nacional definida pela ANVISA/Brasil, nas rotinas dos Lacen's, para atendimento da recomendação da RDC12/2001, onde a determinação de produção de termonuclease e, quando necessário,

a de toxina estafilocócica das linhagens isoladas pode ser realizada a fim de se obter dados de interesse à saúde pública. Dessa forma, a proposta do presente estudo foi implantar essa técnica no Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul, disponibilizando a metodologia para futuras investigações de surtos, ao mesmo tempo em que fazia um estudo retrospectivo da capacidade enterotoxigênica de linhagens de *Staphylococcus aureus* isolados de surtos ocorridos entre 2002 e 2003 no estado. Os resultados obtidos confirmaram a capacidade toxigênica das linhagens, indicaram a importância relativa dos diferentes tipos de toxinas e demonstraram a viabilidade da implantação da metodologia na rotina.

5 CONCLUSÃO

- Os dados epidemiológicos demonstraram que os pratos prontos para consumo foram os mais implicados em surtos de toxinfecção alimentar por estafilococos coagulase positiva;
- Dos 30 alimentos envolvidos nos surtos, 14 apresentavam contagens de *Staphylococcus aureus* superior a 10^6 UFC/g;
- A detecção de enterotoxinas pela técnica de OSP evidenciou que todas as linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas eram produtoras de enterotoxinas, sendo a SEA a prevalente.
- A detecção de enterotoxinas pela técnica de OSP demonstrou ser viável para implantação na rotina do IPB-LACEN/RS, em investigação epidemiológica de surtos de DTA.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M., WEGEBER, H.C., ROSDALH, V.T.. Lack of Staphylococcal Enterotoxin Production Among Strains of *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis in Denmark.. **Acta Veterinária Scaninavica**, v.36, p.273-275, 1995.
- ALMEIDA, R.C.C. *et al.* Avaliação e Controle da Qualidade Microbiológica de Mãos de Manipuladores de Alimentos. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, p.290-294, 1995.
- AMARAL, A.A. **Isolamento de linhagens enterotogênicas de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo colonial – Porto Alegre**. 1997. 59f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- ANDRADE, G.P. ; ZELANTE, F. Ocorrência simultânea de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos nas mãos, boca e fezes em portadores assintomáticos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.23, p.277-84, 1989.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Comitê Brasileiro de Alimentos e Bebidas. **Alimentos-Contagem de *Staphylococcus aureus* em placas Método de ensaio**. Rio de Janeiro, 1991. 4p.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. (A). Staphylococcal Enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, n. 61 p. 1-10 , jun. 2000.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. (B) . AnalyticalChromatography for Recovery of Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins From Food. **International Journal of Food Microbiology**, n. 64, p. 33-40, set. 2000.
- BECKER, K.; ROTH, R. ; PETERS, G. Rapid and Specific Detection of Toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of Two Multiplex PCR Enzyme Immunoassays for Amplification and Hybridization of Staphylococcal Enterotoxin Genes, Exfoliative Toxin Genes, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.9, p. 2548-2553, sept. 1998. Disponível em : <<http://jcm.asm.org/cgi>>. Acessado em: 15 nov. 2006.
- BECKER, K. et al. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*.**Applied and Environmental Microbiology**, 67: 5551-5557, 2001.
- BERGDOLL, M. S. ; REISER, R . Application of Radioimmunoassay for Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Foods. **Journal of Food Protection**, n. 43 , p. 68-72 , 1980.
- BERGDOLL, M.S. Enterotoxins. In *Staphylococci and Staphylococcal Infections* (Easman, C.S.F and Adlam, C., eds.). **Academic Press**, London, UK, pp.559-598, 1983.
- BERGDOLL, M.. Analytical Methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, USA. n. 10, p. 91-100, 1990.

BETLEY, M.J. and MEKALANOS, J.J. .Staphylococcal Enterotoxin A is Encoded by a Phage. **Science**, v.229, p. 185-187, 1985.

BRASIL. Lei nº 8080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. (Lei que se refere à organização enquanto atribuições e competências das várias instâncias no Sistema Único de Saúde). Diário Oficial, Brasília, 20 de setembro de 1990, p. 18.005-9.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC n.12, de 02 de janeiro de 2001, **Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Disponível em: < [http/ www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em 20 jul.2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Boletim Eletrônico Epidemiológico. Ano 5 , N ° 06 de 28 de dezembro de 2005. Disponível em: <[http/ www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs)> Acessado em 08 nov. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Disponível em: <[http/ www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs)> Acessado em 08 nov. 2006.

CARDOSO, H.F.T.; SILVA,N. ; SENA, M.J. ; CARMO, L.S. . Production of Enterotoxins and Toxic Shock Syndrome Toxin by *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastites in Brazil. **Letters In Applied Microbiology**, v. 29, p. 347-349. 1999.

CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S. ;SILVA, N. . Detecção de Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico em Amostras de *Staphylococcus aureus* Isoladas de Mastite Bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n.1, p. 6-7. Feb. 2000. Disponível em : < [http// www.scielo.br/scielo](http://www.scielo.br/scielo)> Acessado em 12 jul. 2005.

DO CARMO, L. S. **Manual para Elucidação de Surtos de Toxinfecção Alimentar por Enterotoxina Estafilocócica**. Belo Horizonte : Fundação Ezequiel Dias (FUNED/MG), p.23, 1998.

CARMO, L. S. *et al.*. An Outbreak of staphylococcal food poisoning in the Municipality of Passos, Mg, Brazil. **Brazilian archives of biology and technology**, Brasil. v.46, n.4 , p.581-586. Dez. 2003.

CHEUNG, A.L. *et al.*, Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** n.89, p. 6462-6466, 1992.

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

DE OLIVEIRA, T.C.R.M. ; HIROOKA, E.Y. Atualidades Sobre Detecção de Enterotoxinas Estafilocócicas. **Boletim de Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30 (2).121-131, jul/dez., 1996.

EVENSON et al. Estimation of Humam Dose of Staphylococcal Enterotoxin A from a Large Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Involving Chocolate Milk. **International Food Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 311-316, dec. , 1988.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed. 2002. 424p.

FITZGERALD et al. Characterization of Putative Pathogenicity Island from bovine *Staphylococcus aureus* Encoding Multiple Superantigens. **Bacteriology**. n. 183, p. 63-70 , 2001.

GOTTARDI, C.P.T. ; SOUZA, C.A.S. ; SCHMIDT, V. Surtos de Toxinfecção Alimentar no Município de Porto Alegre de 1995 a 2002. **Higiene Alimentar**, v. 20, n.143, p. 50-55, ago. 2006.

HAEGLEBAER et al. Les Toxi-infections Alimentaires Collectives en France, en 1999 et 2000. **Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire** , n. 23 , p. 105-109 , 2002.

JAY, J.M. Staphylococcal gastroenteritis. In: **Modern Food Microbiology** (Nostrand, V., ed). 4th edn. Van Nostrand Reinhold, New York, NY, USA, pp.455-478, 1992/2002.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6^a ed.Porto Alegre: Artmed. 711p., 2005.

JOHNSON et al. Deteccion of Genes for Enterotoxins, Exfoliative Toxins, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 426-430, mar.1991.

KAMOGAE, E. M. et al.Cromatografia de Afinidade com Corante RED A *Versus* Troca Iônica – Permeabilidade em Gel: Comparação da Praticidade na Purificação de Enterotoxina Estafilocócica A. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Maio/jul.1998, vol. 18, n°. 2, p.165-168. Disponível em: World Wide Web: http://www.scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120611998000200003=&Ing=pt&nrm=iso>.Acessado em: 29 Maio 2005.

KAMBOJ, D. V. et al. Heterologous Expression of Staphylococcal Enterotoxin B (seb) Gene for Antibody Production. **Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 5 , p. 551- 558, out. 2006.

KHAMBATY, F.M. et al. Application of pulse-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in food-related outbreak. **Epidemiology and Infection**, 113: 75-80, 1994.

KORNBLUM, J. et al. Agr: a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*. In: **Molecular Biology of the Staphylococci** (Novick, R.P. and Shurry, R eds.). VCH, New York, NY, USA, pp. 373-402, 1990.

KLOTZ et al. Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins A to D by Real-Time Fluorescence PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4683- 4687, out. 2003.

LOIR, Y. ; BARON, F. ; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and Food Poisoning. **GMR - Genetics and Molecular Research.**, v.2, n. 1, p. 63-76, mar. 2003.

MESQUITA, M. O. de et al. Microbiological quality in the roast chicken process in nutritional and nourishment unit. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.º., 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612006000100031&lng=es&nrm=iso>. Acessado em 3 Oct. 2006.

NASCIMENTO, F.C.A. Aspectos Sócio-Econômicos das Doenças Veiculadas pelos Alimentos. **Revista Nutrição em Pauta**, São Paulo, n.40 Jan/fev. 2000. Disponível em: <<http://www.nutricaoempauta.com.br>>. Acessado em 10 nov. 2006.

NORMANNO, A et al. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food marketed in Italy. **International Journal Food Microbiology**, v. 98, p.73-79, 2005.

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

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

PEREIRA, M.L. et al. Staphylococcal Food Poisoning from Cream-Filled Cake in a Metropolitan Area of South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 6, p. 406-409, 1996.

PEREIRA, M.L. et al. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas, em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 21(2): 171-175, maio-ago, 2001.

PINTO, A. T. **Ocorrência de enfermidades bacterianas transmitidas por alimentos no estado do Rio Grande do Sul**. 1999.149f. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

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

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual da Saúde. **Distribuição anual dos surtos investigados de doenças transmitidas por alimentos segundo agente etiológico, RS, 1987-2000**, [Porto Alegre]: CCDTA/SES/RS, 2000. Disponível em : <<http://www.saude.rs.gov.br/cves>> Acessado em : 08 nov. 2006.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual da Saúde. SSMA, CEVS 2006. Disponível em : <<http://www.saude.rs.gov.br/cves>> Acessado em : 08 nov. 2006.

ROBBINS, R.; GOULD, S., BERGDOLL, M.S. Detecting the Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* Strains. **Applied Microbiology** , USA, v.28, n.6, p.946-950, 1974.

SABIONI, J. G. ; HIROOKA, E. Y. ; SOUZA, M. L. Intoxicação Alimentar por Queijo Minas Contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 458- 461 , 1988.

SCHWABE, M. et al. Inactivation of staphylococcal enterotoxin by heat and reactivation by high pH treatment. **International Journal Food Microbiology**, 10: 33-42, 1990.

SHAFER, W. M. ; IANDOLO, J. J. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. **Infection. Immunity.**, 20: 273-278, 1978.

SHALITA, Z. et al. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. **Journal Bacteriology**, 129: 317-325, 1977.

SILVA JR , E. A. **Manual de controle higiênico sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 2002. 479p.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. p. 277.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2000. 804p.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. 590p.

VERNOSY- ROZAND, C. et al. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. **Letters in Applied Microbiology**, ed.39, p.400-494, 2004.

WIENEKE, A.A.; ROBERTS, D. ; GILBERT,R.J. Staphylococcal Food Poisoning In the United Kingdom. **Epidemiology Infect.**, n. 110, p.519-531, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Food Safety and foodborne illness**. Jan. 2002. (Fact sheet, 237). Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre> > acessado em 20 de maio de 2005.

ANEXO A – Meio de cultura utilizado para identificação bioquímica dos *Staphylococcus aureus*.

Ágar FAM (Fermentação da Maltose ou Manitol)

Proteose de peptona- 10,0 g

Extrato de carne- 1,0 g

NaCl- 5,0 g

Púrpura de Bromocresol- 0,02 g

Ágar- 15,0 g

Açúcar- 20,0 g

Adicionar: Solução de Maltose ou Manitol a 10% esterilizada por filtração conforme abaixo:

Preparo do Meio:

Suspender os ingredientes em 1 litro de água destilada e aquecer até completa dissolução. Ajustar o pH para $6,8 \pm 0,2$ e distribuir 80,0 mL por frasco. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Guardar o meio em geladeira. Quando usar, dissolver o ágar em banho-maria e deixar esfriar até 45 °C +/- 50 °C. Em seguida, adicionar para cada 80 mL de meio fundido, 20mL da solução de açúcar esterilizada anteriormente por filtração. Distribuir o ágar em placas de Petri (20 mL em cada placa).

Tempo de uso (validade): +/- 1 mês