UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CAMILLA PIRES DE SOUZA

AVALIAÇÃO DO SISTEMA PETRIFILM™ STAPH EXPRESS NA ENUMERAÇÃO DE *Staphylococcus* spp. COAGULASE POSITIVA DE COMIDA JAPONESA

RIO DE JANEIRO
2015

Camilla Pires de Souza

AVALIAÇÃO DO SISTEMA PETRIFILM™ STAPH EXPRESS NA ENUMERAÇÃO DE *Staphylococcus* spp. COAGULASE POSITIVA DE COMIDA JAPONESA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora:
Prof.ª Karen Signori Pereira, D.Sc.

Rio de Janeiro
2015

CIP - Catalogação na Publicação

S719a

Souza, Camilla Pires de
Avaliação do sistema Petrifilm™ Staph Express na enumeração de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva de comida japonesa. / Camilla Pires de Souza. -- Rio de Janeiro, 2015.
78 f.

Orientador: Karen Signori Pereira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2015.

1. *Staphylococcus* spp. coagulase positiva. 2. *Petrifilm™ Staph Express*. 3. Ágar *Baird-Parker*. 4. Sushi. I. Pereira, Karen Signori, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Camilla Pires de Souza

AVALIAÇÃO DO SISTEMA PETRIFILM™ STAPH EXPRESS NA ENUMERAÇÃO DE *Staphylococcus* spp. COAGULASE POSITIVA DE COMIDA JAPONESA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora

(Prof.ª Karen Signori Pereira, D.Sc, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Aprovada em 03 de setembro de 2015.

(Prof.ª Eveline Lopes Almeida, D.Sc, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

(Prof.ª Luciana Maria Ramires Esper, D.Sc, Universidade Federal Fluminense)

(Prof. Robson Maia Franco, D.Sc, Universidade Federal Fluminense)

Rio de Janeiro
2015

À minha avó amada *Arlette*,
minha grande incentivadora,
pelo apoio, carinho e dedicação.

Estas poucas palavras que lhe presto não
expressam a imensa saudade que você deixou.

É a você que eu dedico essa vitória!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Eliane e Antônio por todo apoio, incentivo e carinho ao longo deste percurso;

Ao meu namorado Cristiano pela amizade, paciência, cumplicidade, dedicação, carinho e amor em todos os momentos, inclusive nos mais difíceis;

Ao meu irmão André e todos os meus familiares que me incentivaram e me apoiaram;

À professora Karen Signori pela orientação, amizade, confiança, aprendizado, apoio, e principalmente por estar sempre presente, inclusive me acalmando nos momentos mais difíceis;

À professora Heloísa Sanches pela ajuda com as análises estatística deste trabalho e por todo carinho e atenção;

Aos meus amigos por todo incentivo e torcida para a conclusão desta etapa, principalmente à Verônica e Amanda pelo companheirismo, amizade e atenção que foram essenciais durante a realização deste trabalho;

Aos companheiros de laboratório pelas boas conversas, horas de descontração em momentos exaustivos e auxílio quando solicitados;

Aos restaurantes pela doação das amostras;

À 3M Food Safety pelo patrocínio de parte do material utilizado;

Ao Programa de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos e aos professores por todo o aprendizado;

Ao CNPq pelo conceder a bolsa de estudo durante um ano do Mestrado;

A Deus, que sabe o quanto foi difícil chegar até aqui depois de todos os obstáculos que passei durante essa jornada, estando sempre comigo, dando-me força, coragem e principalmente saúde para conseguir alcançar meus objetivos;

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Parâmetros importantes para o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas em alimentos. 22

Quadro 2. Referências das diferentes enterotoxinas, suas variantes e seus respectivos genes produzidas por *Staphylococcus* spp. descritas até o momento. .. 24

Quadro 3. Espécies de estafilococos coagulase positiva produtores de enterotoxinas e suas caracteristicas fenotípicas quanto à produção das enzimas coagulase e termonuclease. 57

Quadro 4. Espécies de estafilococos produtores de enterotoxinas e suas caracteristicas fenotípicas quanto à produção das enzimas coagulase, DNAse e termonuclease. 59

Figura 1. Preparações à base de pescado cru selecionadas para o estudo. 37

Figura 2. Colônias típicas de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva em ágar *Baird-Parker*. 39

Figura 3. Representação esquemática da enumeração de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva pela metodologia convencional (ágar *Baird-Parker*). 40

Figura 4. Reações do teste da coagulase. 42

Figura 5. Colônias típicas de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva no *Petrifilm™ Staph Express* (A) e reação positiva do uso do disco *Petrifilm™ Staph Express* (B). 44

Figura 6. Diferentes tipos de colônias crescidas no PSE. 48

Figura 7. Diferentes tipos de colônias crescidas no ABP. 49

Figura 8. Frequência dos diferentes tipos de colônias crescidas no PSE e ABP. 50

Figura 9. Frequência das características morfotintoriais das colônias isoladas do PSE. 52

Figura 10. Frequência das características morfotintoriais das colônias isoladas do ABP. 52

Figura 11. Distribuição dos micro-organismos no ABP referente à semana 5. 61

Figura 12. Distribuição dos micro-organismos no PSE referente à semana 5. 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média e desvio padrão das contagens de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva no *Petrifilm™ Staph Express* e ágar *Baird-Parker* das amostras de *sushi* e *filadélfia* dos restaurantes A e B, nas diferentes semanas e seus valores-p de comparação.....46

Tabela 2. Características fenotípicas das colônias isoladas do ABP quanto à produção das enzimas coagulase e termonuclease. 55

Tabela 3. Características fenotípicas das colônias isoladas do PSE referentes a semana 5 quanto à produção das enzimas coagulase, DNAse e termonuclease.....58

Tabela 4. Correlação entre as colônias típicas e atípicas isoladas do PSE e ABP e as características fenotípicas das colônias isoladas quanto à produção das enzimas coagulase e termonuclease.....60

Tabela 5. Média e desvio padrão das contagens de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva confirmados pelos testes bioquímicos adicionais no *Petrifilm™ Staph Express* e ágar *Baird-Parker* das amostras de *sushi* e *filadélfia* dos restaurantes A e B na semana 5 e seus valores-p de comparação.....62

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

Aa	Atividade de Água
ABP	Ágar *Baird-Parker*
ANOVA	*Analysis of Variance*
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	*Association of Official Analytical Chemists International*
APHA	*American Public Health Association*
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC	*American Type Culture Collection*
BAM	*Bacteriological Analytical Manual*
BHI	*Brain Heart Infusion*
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CDC	*Centers for Disease Control and Prevention*
DNA	*Deoxyribonucleic Acid*
ECDC	*European Centre for Disease Prevention and Control*
ECN	Estafilococos Coagulase Negativa
ECP	Estafilococos Coagulase Positiva
EFSA	*European Food Safety Authority*
ELFA	*Enzyme Linked Fluorescent Assay*
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EQ	Escola de Química
ETPGA	*Egg-Tellurite-Pyruvate-Glycine-Agar*
EUA	Estados Unidos da América
FDA	*Food and Drug Administration*
ICMSF	*International Commission on Microbiological Specificons for Foods*
LA	*Latex Agglutination*
MHC	*Major Histocompatibility Complex*
PCR	*Polimerase Chain Reactor*
pH	Potencial Hidrogeniônico
PSE	*Petrifilm™ Staph Express*
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	*Ribonucleic Acid*
RPLA	*Reversed Passive Latex Agglutination*
SE	Enterotoxinas Estafilocócicas
SE*l*	Enterotoxinas Estafilocócicas – *like*
TCR	*T cell receptor*
TSA	*Trypticase Soy Agar*
TSST-1	*Toxic shock syndrome toxin*
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

RESUMO

SOUZA, Camilla Pires de. **Avaliação do sistema Petrifilm™ Staph Express na enumeração de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva de comida japonesa.** Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Staphylococcus spp. são frequentemente relacionados a episódios de intoxicação alimentar. Uma vez que a produção de enterotoxinas é geralmente associada à habilidade de produção da enzima coagulase, a legislação brasileira preconiza enumeração de Estafilococos Coagulase Positiva (ECP) em uma ampla variedade de alimentos, inclusive àquelas preparações que são extremamente manipuladas, como alguns pratos da culinária japonesa. Na metodologia empregada para enumeração de ECP em alimentos utiliza-se meios seletivos e diferenciais, como o ágar *Baird-Parker* (ABP), e requer a amostragem de colônias típicas e atípicas para posterior caracterização de acordo com a capacidade de produção de coagulase e termonuclease, a fim de estimar o potencial enterotoxigênico. Esta metodologia requer longo tempo de análise, além de ser bastante trabalhosa. Uma alternativa seria o sistema *Petrifilm™ Staph Express* (PSE), que permite a contagem de ECP pela observação das características morfológicas das colônias sem a realização dos testes adicionais requeridos pela metodologia convencional. Assim, objetivou-se no presente trabalho avaliar o PSE na enumeração de ECP em preparações à base de pescado cru da culinária japonesa pela comparação com a metodologia convencional descrita pela *American Public Health Association* (APHA), correlacionar as características das colônias isoladas do PSE e ABP com a produção das enzimas coagulase, DNAse e termonuclease, e, ainda, avaliar a qualidade dos produtos analisados conforme os parâmetros pré-estabelecidos pela legislação vigente para ECP. Um total de 60 unidades de *sushi* e *filadélfia* coletadas semanalmente, ao longo de cinco semanas, de dois restaurantes, foram analisadas simultaneamente pelo PSE e ABP. As colônias crescidas foram selecionadas e submetidas aos testes da coagulase e termonuclease para caracterização como ECP. As médias das contagens de ECP pelo PSE e ABP divergiram estatisticamente ($p < 0,05$) nas semanas 1, 2, 3 e 5, quando as análises foram realizadas apenas pela observação das características das colônias, em conformidade com as instruções do fabricante. Na correlação da frequência de colônias presuntivas confirmadas como ECP pelos testes da coagulase e/ou termonuclease de ambos os métodos não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$). Após a caracterização das colônias isoladas do PSE como ECP, não foi observada diferença significativas ($p > 0,05$) entre as médias das contagens médias pelos métodos. As amostras de *sushi* e *filadélfia* de ambos os restaurantes estavam satisfatórias para o consumo considerando-se o parâmetro ECP preconizado pela RDC 12/2001 da ANVISA ($5x10^3$ UFC/g). Nos resultados encontrados observou-se que a utilização do PSE com seleção de colônias para realização dos testes da coagulase e termonuclease é uma alternativa eficaz à metodologia convencional na enumeração de ECP.

Palavras-chave: *Staphylococcus* spp. coagulase positiva. *Petrifilm™ Staph Express.* Ágar *Baird-Parker.* Sushi.

ABSTRACT

SOUZA, Camilla Pires de. **Evaluation of Petrifilm™ Staph Express system in enumeration of *Staphylococcus* spp. coagulase positive in Japanese food.** Rio de Janeiro, 2015. Dissertation (Master's degree in Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Staphylococcus spp. are often associated with food poisoning outbreaks. Once the production of enterotoxin is usually associated with the ability to produce the coagulase, the Brazilian legislation recommends only the count of Coagulase-Positive Staphylococci (CPS) in a wide variety of foods, including food-handling preparations, as some Japanese cuisine. In the methodology employed for CPS enumeration in food it used selective and differential media, such as Baird-Parker agar (BPA), and requires a sampling of typical and atypical colonies to characterization according to coagulase or thermonuclease production ability in order to estimate the enterotoxigenic potential. This methodology requires long time analysis, besides being quite labor intensive. An alternative would be Petrifilm™ Staph Express System (PSE), which allows ECP counting by morphological characteristics of the colonies, without additional biochemical tests required by conventional methodology. The aim of this study was to evaluate the PSE for the enumeration of ECP in Japanese food by comparison with conventional methodology described by the American Public Health Association (APHA), to correlate isolated colonies from PSE and ABP characteristics with coagulase, DNase and thermonuclease production, and to evaluate the products analyzed quality according to Brazilian legislation parameter to ECP. A total of 60 *sushi* and *philadelphia* rolls units were collected weekly – over five weeks – from two restaurants and were analyzed simultaneously by the PSE and BPA. The grown colonies were selected and were submitted to coagulase and thermonuclease tests to characterization as ECP. The mean counts obtained for ECP by PSE and ABP diverged statistically ($p < 0,05$) in weeks 1, 2, 3 and 5, when the analyzes were carried out only by observing the colonies characteristics, according to the manufacturer's instructions. In the correlation between the frequency of presumptive colonies confirmed as ECP confirmed by the coagulase and/or thermonuclease tests of both methods were no significant differences ($p > 0,05$). After characterization of the PSE colonies isolated, there was no significant differences ($p > 0.05$) between the means obtained by the both methods. Samples of sushi and Philadelphia rolls were satisfactory for consumption considering the parameter recommended by Brazilian legislation ($5x10^3$ CFU/g). In result, it was observed the use of PSE with selection of colonies to coagulase and thermonuclease test is an effective alternative to conventional ECP methodology for enumeration.

Keywords: Coagulase-positive *Staphylococcus* spp. *Petrifilm™ Staph Express. Baird-Parker* agar. Sushi.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
2.1. O Gênero *Staphylococcus* 15
2.2. Importância de *Staphylococcus* spp. como Patógenos Alimentares 17
2.2.1. Intoxicação Alimentar Estafilocócica 18
2.2.2. *Staphylococcus* spp. Coagulase Positiva Enterotoxigênicos 20
2.2.3. Enterotoxinas Estafilocócicas 23
2.3. Detecção de *Staphylococcus* spp. Coagulase Positiva em Alimentos 28
2.3.1. Enumeração em Ágar *Baird-Parker* 29
2.3.2. Sistema *Petrifilm™ Staph Express* 31
2.4. Comida Japonesa e o Consumo do Pescado Cru 32
3. OBJETIVOS 36
3.1. Objetivo Geral 36
3.2. Objetivos Específicos 36
4. MATERIAIS E MÉTODOS 37
4.1. Amostras de Comida Japonesa 37
4.2. Preparação das Amostras e Diluições 38
4.3. Medição de pH 38
4.4. Enumeração de *Staphylococcus* spp. Coagulase Positiva 38
4.4.1. Plaqueamento em Ágar *Baird-Parker* 38
4.4.1.1. Coloração de Gram 41
4.4.1.2. Teste da Catalase 41
4.4.1.3. Teste da Coagulase 41
4.4.1.4. Teste da DNAse e Termonuclease 42
4.4.1.5. Teste de Sensibilidade à Furazolidona 42
4.4.1.6. Cálculo dos Resultados 43
4.4.2. Plaqueamento em *Petrifilm ™ Staph Express* 43
4.5. Controle 45
4.6. Análise Estatística 45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 46
5.1. Comparação entre o *Petrifilm™ Staph Express* e o Ágar *Baird-Parker* na Enumeração de *Staphylococcus* spp. Coagulase Positiva em Preparações à base de Pescado Cru da Culinária Japonesa 46
5.2. Correlação entre as Características das Colônias com os Testes da Coagulase, DNAse e Termonuclease 54
5.3. Avaliação da Qualidade Microbiológica do *Sushi* e *Filadélfia* pela Pesquisa de *Staphylococcus* spp. Coagulase Positiva 64
6. CONCLUSÕES 66

APÊNDICE A – pH DAS AMOSTRAS DE SUSHI E FILADÉLFIA DOS RESTAURANTES A E B. 76

APÊNDICE B – ENUMERAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA NAS AMOSTRAS DE SUSHI E FILADÉLFIA DO RESTAURANTE A. 77

APÊNDICE C – ENUMERAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA NAS AMOSTRAS DE SUSHI E FILADÉLFIA DO RESTAURANTE B. 78

1. INTRODUÇÃO

A contaminação de alimentos por *Staphylococcus* spp. é um problema de saúde pública, uma vez que algumas espécies são capazes de produzir enterotoxinas estafilocócicas, que se ingeridas podem levar ao surgimento dos distúrbios gastrintestinais associados com a intoxicação alimentar estafilocócica (JABLONSKI; BOHACH, 2001).

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das doenças alimentares de maior prevalência no mundo. O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que a cada ano 48 milhões de pessoas são acometidas por doenças alimentares, 128.000 pessoas são hospitalizadas e 3.000 morrem. Apenas a espécie *Staphylococcus aureus* é a causa de 241.000 intoxicações por ano nos Estados Unidos da América (EUA) (SCALLAN et al., 2011). Estima-se que em cada caso de intoxicação alimentar estafilocócica é gasto cerca de US$ 695,00, o que representa um custo total de US$ 167.597.860,00 anualmente (BYRD-BREDBENNER et al., 2013; KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014).

A *European Food Safety Authority* (EFSA) e o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) notificaram um total de 5.196 surtos de doenças alimentares, incluindo surtos de doenças de veiculação hídrica, na União Europeia em 2013, afetando cerca de 43.183 pessoas, causando 5.946 hospitalizações e 11 mortes. Entre esses, 386 surtos foram causados por *Staphylococcus* spp. e suas enterotoxinas, apresentando um aumento de 7,4% nos casos quando comparado com o ano anterior (EFSA; ECDC, 2015).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, entre 2000 e 2014, foram notificados 9.719 surtos de doenças alimentares com acometimento de 192.803 e exposição de 1.948.144 pessoas. Dentre estes surtos, o agente etiológico foi identificado em apenas 48,66% dos casos e a espécie *S. aureus* foi responsável por aproximadamente 897 surtos, sendo o segundo maior agente causador de DTA (SVS, 2014).

Nesse sentido, métodos analíticos microbiológicos eficazes são imprescindíveis para verificação da presença de micro-organismos patogênicos em alimentos (RODRIGUES et al., 2011). Tradicionalmente, a pesquisa de

Staphylococcus spp. coagulase positiva em alimentos é realizada por de metodologias convencionais de cultivo microbiológico em meios seletivos e diferenciais, como ágar *Baird-Parker,* precedidos de testes bioquímicos adicionais, como os testes da coagulase e termonuclease, para confirmar e estimar o potencial enterotoxigênico dessas bactérias pela correlação da presença dessas enzimas com a habilidade de produção de enterotoxinas. No entanto, a metodologia convencional é trabalhosa, requer longo tempo de análise e imprecisa. Além disso, por demandarem uma série de etapas, há elevados custos com materiais, como meios de cultivo e reagentes (SILVA et al., 2007).

Como alternativa à metodologia clássica, novos métodos vêm sendo propostos para a enumeração e isolamento destas bactérias em menor tempo para liberação dos resultados finais e com maior confiabilidade, permitindo maior agilidade na adoção de medidas corretivas e preventivas, a fim de evitar que alimentos contaminados sejam consumidos pela população.

Sendo assim, objetivou-se neste trabalho avaliar o sistema *Petrifilm™ Staph Express* na enumeração de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva em comida japonesa pela comparação com o ABP, correlacionar as características das colônias isoladas de ambos os métodos com a produção das enzimas coagulase, DNAse e termonuclease, e ainda, avaliar a qualidade microbiológica das preparações à base de pescado cru da culinária japonesa de acordo com parâmetros pré-estabelecidos pela legislação vigente para este micro-organismo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Gênero *Staphylococcus*

O nome *Staphylococcus*, do grego *"staphyle"* de cacho de uva e "*coccus"* de grão ou semente, foi mencionado pelo médico escocês Alexander Ogston em 1880 a um grupo de células bacterianas esféricas de arranjo irregular, semelhantes a cachos de uva, isoladas pela primeira vez em 1878 por Robert Koch de abscessos purulentos (STRATTON, 1982; OGSTON; WITTE, 1984).

Em 1884, o cirurgião alemão Friedrich Julius Rosenbach descreveu duas espécies conforme a presença e ausência de pigmentos: *S. pyogenes aureus* e *S. pyogenes albus* (posteriormente denominadas de *S. aureus* e *S. epidermidis*, respectivamente); e propôs a criação do gênero *Staphylococcus* (BAIRD-PARKER, 1990). Este gênero foi agrupado previamente na família Micrococcaceae, juntamente como gêneros *Micrococcus*, *Planococcus* e *Stomatococcus,* devido semelhanças em características bioquímicas e morfológicas. Entretanto, conceitos filogenéticos já revelavam que tais gêneros não estavam intimamente relacionados e desde então, o gênero *Staphylococcus* vem sofrendo diversas alterações e modificações (KLOOS; SCHLEIFER, 1986; BECKER; VON EIFF, 2011).

Apenas com o avanço das técnicas de biologia molecular, a taxonomia e filogenia dos gêneros foram revistas, sendo possível realizar uma distinção clara entre os gêneros da família Micrococcaceae (GÖTZ; BANNERMAN; SCHLEIFER, 2006). Estudos genéticos de hibridização de ácidos nucléicos, perfis de ácidos graxos, composição de parede celular e, principalmente, análises comparativas entre sequências de ácido ribonucleico (RNA do inglês *Ribonucleic Acid*) ribossômico 16S de bactérias conduziram à proposição de várias mudanças taxonômicas e filogenéticas, e então o gênero *Staphylococcus* foi incluído numa nova família: Staphylococcaceae (GARRITY; HOLT, 2001). Dentro dessa família, composta por bactérias Gram-positivas com baixo teor de G+C do ácido desoxirribonucleico (DNA do inglês *Deoxyribonucleic Acid*), também foram incluídos os gêneros *Macrococcus*, *Salicinococcus* e *Jeotgalicoccus* (LUDWIG; SCHLEIFER; WHITMAN, 2008).

Assim, o gênero *Staphylococcus* passou a fazer parte da ordem Bacillales bem como a família Bacillaceae, por possuir grande relação genética com bactérias do

gênero *Bacillus.* Além disso, a família Staphylococcaceae foi incluída no filo Firmicutes, diferentemente da família Micrococcaceae, a qual pertence ao filo Actinobacteria, evidenciando, assim, a distância filogenética entre os gêneros inicialmente agrupados (GARRITY; HOLT, 2001).

Atualmente, o gênero *Staphylococcus* compreende 51 espécies e 27 subespécies (EUZÉBY, 2015), que são caracterizadas como cocos Gram-positivas, com o diâmetro de suas células variando entre 0,5 a 1,5 µm, imóveis, não formadoras de esporos, podendo aparecer de forma isolada, em pares, cadeias curtas ou em cachos, catalase positivas (exceção para *S. aureus* subsp. *anaerobius* e *S. saccharolyticus*), oxidase negativa (exceto *S. caseolyticus*, *S. lentus* e *S. sciuri, S. fleurettii,* e *S. vitulinus*) e com 30 a 40% de conteúdo G+C em seu DNA (JABLONSKI; BOHANCH, 2001; BECKER; VON EIFF, 2011). A parede celular dos estafilococos é composta majoritariamente por ácido teicóico, peptideoglicano e proteínas, apresentando resistência a lisozima e sensibilidade a lisostafina, que cliva especificamente as pontes cruzadas de peptideoglicano com pentaglicina (ZYGMUNT; BROWDER; TAVORMINA, 1967).

As espécies desse gênero possuem metabolismo quimiorganotrófico fermentativo e respiratório (HOLT et al., 1994), são mesófilas, no entanto, crescem numa ampla faixa de temperatura (7 a 48 °C) e pH (4 a 9,8), toleram concentrações salinas e nitratos que variam entre 10% a 20%, e possuem a capacidade de se desenvolverem em baixos valores de atividade de água (0,83 a 0,86) (ICMSF, 1996), sendo resistentes a condições severas.

Desde 1925, *Staphylococcus* spp. são tradicionalmente divididos em dois grupos baseado na habilidade de produção da enzima coagulase: Estafilococos Coagulase Positiva (ECP) e Estafilococos Coagulase Negativa (ECN) (BECKER; VON EIFF, 2011). O fator enzimático coagulase é responsável por coagular o plasma sanguíneo. Algumas espécies de estafilococos produzem a coagulase livre, a qual é responsável por catalisar a reação entre uma substância presente no plasma e o fibrinogênio formando fibrina. Outras espécies produzem a coagulase adsorvida na superfície da parede celular bacteriana, conhecida como fator *clumping*, que reage diretamente com o fibrinogênio presente no plasma, produzindo uma rápida aglutinação das células bacterianas. A enzima coagulase não atua sozinha, mas com

muitos outros fatores celulares e toxinas estafilocócicas em um fenômeno complexo de patogenicidade que contribuem para a virulência deste micro-organismo (HALPIN-DOHNALEK; MARTH, 1989).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são ubíquas e estão amplamente distribuídas na natureza, sendo os seus principais reservatórios o homem e outros animais. São encontradas principalmente como parte da microbiota residente, na superfície da pele, nos pelos e principalmente nas mucosas oral e nasal destes hospedeiros. Apesar dessa relação simbiôntica, muitas espécies do gênero são oportunistas e estão frequentemente associadas a uma ampla variedade de infecções e toxinfecções em animais e humanos (BECKER; VON EIFF, 2011).

2.2. Importância de *Staphylococcus* spp. como Patógenos Alimentares

Os alimentos são passiveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos que podem levar ao desenvolvimento de infecções e intoxicações. A versatilidade nutricional e a capacidade de crescerem em diferentes condições ambientais determinam a facilidade com que *Staphylococcus* spp. são capazes de se desenvolverem em uma ampla variedade de alimentos (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

A contaminação por bactérias do gênero *Staphylococcus* é frequentemente decorrente de falhas nas práticas higiênico-sanitárias durante a manipulação, processamento, armazenamento ou distribuição dos alimentos (HENNEKINNE et al., 2010). Além disso, a capacidade de algumas espécies de formar biofilmes, resistir ao congelamento e à dessecação permite a persistência dessas bactérias em superfícies, equipamentos e utensílios utilizados na indústria alimentícia ou em ambientes de processamento de alimentos, constituindo também uma importante fonte de contaminação (BERGDOLL; WONG, 2006).

2.2.1. Intoxicação Alimentar Estafilocócica

A associação dos estafilococos com as doenças alimentares é feita desde o século XIX. Historicamente, a primeira investigação sobre a intoxicação alimentar estafilocócica ocorreu em 1894 por J. Denys, na França, devido consumo de carne de vaca contaminada (DACK, 1943). Entretanto, o real envolvimento dos estafilococos em intoxicações alimentares foi evidenciado em 1914, quando M. Barber relacionou as desordens gastrintestinais com consumo de leite inoculado com cultura de "*Staphylococcus brancos*", e somente em 1930, que G. M. Dack e colaboradores, de maneira conclusiva, demonstraram que uma substância solúvel termoestável, denominada posteriormente de "enterotoxina" pela atuação no trato gastrintestinal, era a responsável pela enfermidade, uma vez que observaram o surgimento dos sintomas após a ingestão de culturas filtradas de estafilococos (HAYNES; HUCKER, 1946).

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das causas mais comuns de gastroenterites no mundo. A enfermidade é desencadeada pela ingestão de alimentos contaminados com as enterotoxinas pré-formadas e não pelos próprios estafilococos potencialmente enterotoxigênicos (JABLONSKI; BOHACH, 2001).

O quadro clínico da intoxicação caracteriza-se pelo curto período de incubação, que varia de 30 minutos a 8 horas, náusea, emese, dores abdominais e, às vezes, diarreia (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). A intensidade dos sintomas pode variar conforme o grau de suscetibilidade do indivíduo, a concentração da enterotoxina presente no alimento e a quantidade de alimento ingerida (JABLONSKI; BOHACH, 2001).

A recuperação ocorre em torno de dois dias, porém, alguns casos podem levar mais tempo ou exigir hospitalização. A ocorrência de óbito é bastante rara e acontece, aproximadamente, em 0,03% dos casos de intoxicação, a qual pode aumentar em populações de risco (MONTEVILLE; MATTHEWS, 2008), como indivíduos idosos e crianças, devido à possível ocorrência de quadros de desidratação severa (BALABAN; RASOOLY, 2000).

No entanto, Carmo et al. (2004) relataram um surto de intoxicação estafilocócica ocorrida em 1998 no estado de Minas Gerais durante uma cerimônia religiosa, onde 4.000 indivíduos de diferentes idades foram acometidos, apresentando

em menos de 4 horas gastrenterite aguda. Aproximadamente 2.000 indivíduos (50% daqueles que apresentaram os sintomas) buscaram atendimento médico, 396 indivíduos (20% daqueles que foram para hospital) necessitaram de internação e 81 indivíduos (20% dos internados), foram levados para o CTI por causa da severa desidratação, com morte de 17 desses pacientes (20%), dentro de 72 h. Neste estudo observou-se a magnitude e severidade da intoxicação alimentar estafilocócica.

A quantidade de enterotoxina necessária para causar a intoxicação alimentar ainda não está bem estabelecida, porém sabe-se que fatores como a susceptibilidade do indivíduo, o peso corporal e, especialmente, o estado de saúde da pessoa acometida, irão influenciar no desencadeamento dos sintomas (JABLONSKI; BOHACH, 2001). Em um estudo nos Estados Unidos com leite achocolatado implicado em surto de intoxicação estafilocócica, Evenson et al. (1988), concluíram que em humanos a dose mínima de enterotoxina do tipo A suficiente para o surgimento dos sintomas é de 100 a 200 ng. Logo, acredita-se que a ingestão de uma dose menor que 1 µg de enterotoxinas é capaz de causar gastroenterite, e essa quantidade é atingida, geralmente, quando a população de estafilococos alcança valores acima de 10^6 células/g de alimento (BENETT; MONDAY, 2003).

Os alimentos implicados em casos e surtos de intoxicação alimentar estafilocócica variam entre os países e, inclusive, entre as regiões de um mesmo país, devido às possíveis diferenças nos hábitos alimentares (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). No entanto, é consenso que os quadros desta intoxicação alimentar estão frequentemente associados a alimentos que exigem intensa manipulação antes, durante ou após o seu preparo e, principalmente, que sejam acondicionados em temperaturas inadequadas, favorecendo assim a multiplicação dos estafilococos e a produção de suas enterotoxinas (JABLONSKI; BOHACH, 2001; MONTEVILLE; MATTHEWS, 2008; SANTANA et al., 2010).

A intoxicação alimentar estafilocócica ainda é apontada como uma doença subnotificada devido seu caráter auto limitante, de curta duração e sintomatologia branda, raramente levando os indivíduos acometidos a procurarem assistência médica, o que complica a confirmação laboratorial, fazendo com que o índice de notificação, seja relativamente baixo em todo o mundo (SCALLAN et al., 2006; BENNETT; WALSH; GOULD, 2013).

No Brasil, os dados da Vigilância Epidemiológica são limitados, uma vez que além de ser considerada uma doença de notificação não compulsória e acontecer com frequência em residências (SVS, 2014), estudos que determinem a prevalência dos variados tipos de enterotoxinas e o caráter endêmico e/ou epidêmico da doença ainda são considerados escassos em algumas regiões do país (VIÇOSA, 2012). Outros fatores como frequente erro diagnóstico dos profissionais de saúde, equívocos na coleta das amostras para testes laboratoriais e investigações epidemiológicas inadequadas ou inconclusivas acabam por comprometer a geração de informações e agravar este panorama (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010; VIÇOSA, 2012).

2.2.2. *Staphylococcus* spp. Coagulase Positiva Enterotoxigênicos

Inicialmente, durante muitos anos, a capacidade de produção das enterotoxinas era considerada característica exclusiva de membros da espécie *S. aureus*, cuja maioria é produtora da enzima coagulase. Desta forma, o teste de presença desta enzima passou a servir como marcador de enterotoxigenicidade quando da identificação de estafilococos presentes em alimentos implicados em casos e surtos de intoxicação e na análise microbiológica de alimentos (ICMSF, 1983; DESMARCHELIER et al., 1999).

A capacidade de produzir a coagulase é restrita às espécies *S. delphini, S. hyicus, S. intermedius, S. lutrae, S. pseudintermedius,* e subespécies *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. aureus* subsp. *aureus, S. schleiferi subsp. coagulans* (EUZÉBY, 2015). Porém, além da espécie *S. aureus,* outras espécies coagulase positiva, como *S. delphini*, *S. hyicus,* e *S. intermedius* também produzem enterotoxinas (JAY, 2005).

Em função desta correlação, no ano de 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº12 alterou legislação brasileira de Padrões Microbiológicos para Alimento. A determinação de "*S. aureus"* foi substituída por enumeração de "ECP" (BRASIL, 2001). No entanto, a enumeração de ECP não reflete a real quantidade de *Staphylococcus* spp. potencialmente enterotoxigênicos presentes no produto, visto que, para algumas linhagens coagulase positiva não tem sido verificada a capacidade de produção de

enterotoxinas (BAIRD-PARKER, 1990) e diversas espécies de ECN têm sido relatadas como produtoras de enterotoxinas (VERAS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; RALL et al., 2010), inclusive já estiveram envolvidas em três surtos (OMORI; KATO, 1959; BRECKINRIDGE; BERGDOLL, 1971; CARMO et al., 2002).

Uma vez que a enfermidade é causada pela ingestão da toxina termoestável presente no alimento, e não pela ingestão dos estafilococos, a detecção do micro-organismo não é necessariamente indicativa da presença da mesma (BAIRD-PARKER, 1990). Mesmo assim, na legislação brasileira ainda é utilizado o número de ECP como parâmetro microbiológico oficial para análise de alimentos, sem mencionar limites para a detecção de enterotoxinas (BRASIL, 2001). Tal determinação consta apenas na Diretiva 2073/2005 da UE: quando produtos lácteos, em especial o queijo, contiver contagens de ECP acima de 10^5 UFC/g, há necessidade de se testar a amostra para enterotoxinas (CE, 2005).

Dentre os ECP, as espécies patogênicas de maior importância em alimentos são *S. aureus, S. intermedius* e *S. hyicus* (BAIRD-PARKER, 1990), sendo a produção da enzima coagulase por este último variável, frequentemente considerada muito fraca ou negativa (HERMANS et al., 2008).

Além da produção de coagulase, estas três espécies possuem diversas outras semelhanças em características bioquímicas, como a produção da enzima termonuclease, uma endonuclease termoestável capaz de degradar DNA e RNA, que está muitas vezes associada com a presença de coagulase (VICTOR et al, 1969; MENZIES, 1977), e consequentemente com a produção de enterotoxinas (BOOTHBY; GENIGEORGIS; FANELLI, 1979).

O crescimento dos estafilococos e a produção de enterotoxinas em alimentos são eventos geralmente associados e influenciados diretamente por parâmetros físicos e químicos como temperatura, potencial hidrogeniônico (pH), atividade de água (Aa), concentração salina e disponibilidade de oxigênio, assim como pela linhagem, presença de outros micro-organismos e pelo tipo de enterotoxina (BERGDOLL, 1989).

Em geral, a produção de enterotoxinas por *S. aureus* tende a ser favorecida entre 35-37 °C, pH próximo a neutralidade, de 6 a 7, Aa ≥ 0,99, concentrações salinas de até 10% e em aerobiose (Quadro 1).

Parâmetro	Desenvolvimento		Produção de Enterotoxinas	
	Ótimo	**Variação**	**Ótima**	**Variação**
Temperatura (°C)	35 – 37	7 – 48	35 – 37	10 – 45
pH	6,0 – 7,0	4,0 – 10,0	6,0 – 7,0	4,8 – 9,0
Atividade de água	> 0,99	0,83 – 0,99	0,99	0,83 – 0,99
Cloreto de sódio (%)	0 – 4	0 – 20	0 – 0,5	0 – 10
Atmosfera	Aeróbica	Aeróbica Anaeróbica	Aeróbica (5-20% de O_2)	Aeróbica Anaeróbica

Quadro 1. Parâmetros importantes para o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas em alimentos.
Fonte: ICMSF, 1996.

Entretanto, a produção de enterotoxinas pode ocorrer numa ampla faixa de temperatura, entre 10-45 °C, apesar da refrigeração ser a maneira mais eficaz de reduzir a multiplicação deste micro-organismo nos alimentos passíveis de contaminação (BAIRD-PARKER, 1990; ICMSF, 1996). O efeito da Aa e pH sobre a produção de enterotoxinas e a multiplicação de *S. aureus* não ocorre de forma isolada, sendo afetada por outras condições ambientais aos quais esse micro-organismo está submetido, como temperatura e disponibilidade de oxigênio (BERGDOLL; WONG, 2006; JAY, 2005).

Mesmo *S. aureus* sendo anaeróbio facultativo, se multiplicando e produzindo enterotoxina tanto na presença de oxigênio (devido à capacidade de degradação dos radicais livres pela enzima catalase) quanto na ausência, já foi observado que em cultivo laboratorial e sob condições ótimas o seu tempo de geração é quase duas vezes menor em aerobiose do que em anaerobiose, demonstrando que no mesmo período de tempo a produção de enterotoxinas por *S. aureus* em condições aeróbicas é significativamente maior do que a quantidade produzida sob anaerobiose (BELAY; RASOOLY, 2002).

A capacidade de multiplicação e produção de enterotoxinas por *S. aureus* é também afetada pela presença de outros micro-organismos, exceto em situações em que a sua população inicial é significativamente maior do que as demais populações bacterianas (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

2.2.3. Enterotoxinas Estafilocócicas

As enterotoxinas estafilocócicas (SE do inglês *staphylococcal enterotoxins*) pertencem a uma grande família de exotoxinas pirogênicas com sequências homólogas e uma relação filogenética comum (BALABAN; RASSOLY, 2000). São um grupo de proteínas extracelulares de cadeia simples, hidrossolúveis, com baixo peso molecular (26-30 kDa) (SORIANO et al., 2002) e ponto isoelétrico entre 7,0 e 8,6. Suas cadeias polipeptídicas são ricas em lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e tirosina (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

Em seu estado ativo, as SE possuem uma estrutura compacta, o que confere resistência a enzimas proteolíticas como pepsina, tripsina, renina e papaína (FRANCO; LANDGRAF, 2008), resistindo dessa forma, à hidrólise pelas enzimas gástricas e intestinais e mantendo sua atividade no trato digestório após ingestão (HAIT, 2012), bem como a permanência em determinados alimentos (THOMAS et al., 2007). Além disso, as SE são termorresistentes (DABROWSKI; SIKORSKI, 2005), sendo capazes de resistir à cocção e tratamentos térmicos como a pasteurização e a ultrapasteurização, e resistentes ao congelamento e secagem, com manutenção de sua atividade e consequente risco aos consumidores (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

A nomenclatura de cada enterotoxina estafilocócica dá-se conforme as letras do alfabeto segundo a ordem cronológica de suas descobertas. Já foram descritas até o momento 21 tipos de enterotoxinas distintas, com base em suas diferenças sorológicas: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET, SEU e SEV, codificadas pelos genes *sea* a *sev*. Para algumas como SEC, SEG, SEI, SEN e SEU, já têm sido relatadas algumas variantes (ARGUDÍN; MENDONZA; RODICIO 2010). A toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1 do inglês *Toxic Shock Syndrome Toxin*-1) foi equivocadamente designada SEF e por isto não existe a enterotoxina sorotipo F (JABLONSKI; BOHANCH, 2001).

Um resumo dos diversos estudos sobre os sorotipos e genes codificadores de SE já identificados, seus autores e o ano da publicação foi apresentado por Borges (2006) e segue atualizado conforme representação no Quadro 2.

Enterotoxinas	Genes Codificadores	Referência
SEA	*sea*	Betley; Mekalanos (1988);Becker et al. (1998)
SEB	*seb*	Bergdoll et al. (1959); Jones; Khan (1986); Becker et al. (1998)
SEC_1	sec_1	Bergdoll et al. (1965); Borja; Bergdoll (1967); Bohach; Schievert (1987); Becker et al.(1998)
SEC_2	sec_2	Bergdoll et al. (1965); Avena; Bergdoll (1967);
SEC_3	sec_3	Reiser et al. (1984)
SED	*sed*	Casman et al. (1967); Bayles; Iandolo (1989); Becker et al. (1998)
SEE	*see*	Bergdoll et al. (1971); Couch et al. (1988); Becker et al. (1998)
SEG	*seg*	Betley et al. (1992); Munson et al. (1998); Omoe et al. (2002)
SEG_v	seg_v	Blaiotta et al. (2004)
SEH	*seh*	Ren et al. (1994); Su; Wong (1995); Omoe et al. (2002)
SEI	*sei*	Munson et al. (1998); Omoe et al. (2002)
SEI_v	sei_v	Blaiotta et al. (2004)
SE/J	*sej*	Zhang et al. (1998); Omoe et al. (2005)
SE/K	*sek*	Orwin et al. (2001); Omoe et al. (2005)
SE/L	*sel*	Fitzgerald et al. (2001); Omoe et al. (2005)
SE/M	*sem*	Jarraud et al. (2001); Omoe et al. (2005)
SE/M	*sen*	Jarraud et al. (2001); Orwin et al. (2003); Omoe et al. (2005)
SE/N_v	sen_v	Blaiotta et al. (2004)
SE/O	*seo*	Jarraud et al. (2001); Omoe et al. (2005)
SE/P	*sep*	Omoe et al. (2005)
SE/Q	*seq*	Yarwood et al. (2002); Omoe et al. (2005)
SER	*ser*	Omoe et al. (2003); Omoe et al. (2005)
SES	*ses*	Omoe et al. (2003); Ono et al. (2008)
SET	*set*	Omoe et al. (2003); Ono et al. (2008)
SE/U	*seu*	Letertre et al. (2003)
SE/U_v	seu_v	Blaiotta et al. (2004); Thomas et al. (2006)
SE/V	*sev*	Thomas et al. (2006)

Quadro 2. Referências das diferentes enterotoxinas, suas variantes e seus respectivos genes produzidas por *Staphylococcus* spp. descritas até o momento.
Fonte: BORGES, 2006 (modificado).

Os diferentes sorotipos das enterotoxinas são semelhantes na composição e atividade biológica, mas são diferentes em antigenicidade (HAIT, 2012), sendo tradicionalmente cinco tipos conhecidos como “clássicos” (SEA, SEB, $SEC_{1, 2, 3,}$ SED e SEE), e os mais recentemente descritos (SEG a SEI e SER a SET), todos com atividade emética. Há, também, dentre as enterotoxinas mais recentemente descritas, os sorotipos denominados de SE-*like* (SE*l*), uma vez que não possuem ação emética (SE*l*L e SE*l*Q), ou ainda não foram confirmadas (SE*l*J, SE*l*K, SE*l*M a SE*l*P, SE*l*U e SE*l*V) (ARGUDÍN; MENDONZA; RODICIO, 2010).

A capacidade das SE em induzir emese pode ter intensidades variadas nos diferentes sorotipos. Pesquisadores já demonstraram que a presença do laço dissulfídico encontrado na porção N-terminal das SE com forte atividade emética, apesar de não determinante, é capaz de estabilizar a proteína em uma conformação específica para que ocorra a emese. A ausência este laço foi observado em SE*l*L e SE*l*Q e em SEI, que possui baixa capacidade emética (ONO et al., 2008).

Todas as SE e SE*l* possuem atividade de superantígenos, interagindo diretamente com os receptores de antígenos das células T (TCR do inglês *T Cell Receptor*) e com o complexo maior de histocompatibilidade (MHC do inglês *Major Histocompatibility Complex*) de classe II das células apresentadoras de antígenos (APC do inglês *Antigen Presenting Cells*). Esta interação leva a ativação e proliferação das células T não-específicas e secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, que podem estar envolvidas nos mecanismos de toxicidade das enterotoxinas (THOMAS et al., 2007; ARGUDÍN, MENDONZA; RODICIO, 2010).

As SE quando ingeridas, apresentam algumas ações no trato gastrintestinal como a atividade emética e diarreica (FRANCO; LANDGRAF, 2008). O mecanismo de ação que leva ao surgimento da emese ainda não está totalmente esclarecido, entretanto, acredita-se que a atividade emética apresenta correlação com a atividade superantigênica, visto que em cepas mutantes sem atividade superantigênica, a capacidade de induzir emese também foi perdida (HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012).

A ação emética é o sintoma observado com maior frequência na gastroenterite estafilocócica. Acredita-se que as SE penetram pela parede intestinal e ativam o sistema imunológico local, causando a liberação de diversos mediadores

inflamatórios. Em seguida, as SE atingem a circulação sanguínea e se disseminam pelo corpo, onde podem induzir ao choque tóxico por atuarem como superantígenos (THOMAS et al., 2007). No intestino, as SE estimulam o nervo vago através de um estímulo aferente, em que o sinal é transmitido ao centro do vômito no cérebro e induz a retroperistalsia do estômago e do intestino delgado provocando emese. Por esta razão, as toxinas estafilocócicas deveriam ser dominadas neurotoxinas e não enterotoxinas (THOMAS et al., 2007; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A ação diarreica também não possui seu mecanismo de ação bem conhecido, no entanto, acredita-se que ocorre uma inflamação e irritação da mucosa, com inibição da reabsorção de eletrólitos e água no intestino delgado (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os genes codificadores das SE e SE*l* estão presentes em elementos géneticos acessórios, incluindo plasmídeos, bacteriófagos e ilhas de patogenicidade cromossomal (ARGUDÍN, MENDONZA; RODICIO, 2010), o que pode resultar na transferência horizontal desses genes entre as linhagens de estafilococos potencialmente enterotoxigênicas, consistindo, dessa forma, como um importante papel na evolução das bactérias do gênero *Staphylococcus* como agentes patogênicos (OMOE et al., 2002; VASCONCELOS; CUNHA, 2010).

Em relação às SE clássicas, o gene que codifica SEA é carreado por um bacteriófago (JABLONSKI; BOHACH, 2001), e o gene que codifica a SEB é um gene cromossomal. As SEC são um grupo de proteínas altamente conservadas, e os seus três subtipos antigenicamente distintos (SEC_1, SEC_2 e SEC_3), são codificados por um gene localizado em uma ilha de patogenicidade. O gene que codifica SED está localizado em um plasmídeo. SEE compartilha alta homologia (81%) com SEA e seu gene é carreado por um fago incompleto (BALABAN; RASOOLY, 2000).

A detecção das SE é importante não só no estudo epidemiológico de casos e surtos envolvendo tais bactérias, mas também, para revelar a qualidade dos alimentos que estão sendo comercializados e os possíveis riscos aos consumidores. Muitos métodos de detecção têm sido desenvolvidos, os quais podem ser diretos (ensaios biológicos e imunológicos) ou indiretos (métodos moleculares) (VASCONCELOS; CUNHA, 2010; KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014).

Os ensaios biológicos foram os primeiros métodos para a detecção das SE, os quais eram baseados em testes *in vivo* (animal), ou *in vitro* (cultura de tecido). As amostras suspeitas eram administradas via intraperitoneal ou intravenosa em gatos e via oral em macaco Rhesus (*Macaca mullata*) para a observação dos efeitos eméticos. Porém este método possui certas desvantagens como a variação na sensibilidade dos animais, a inabilidade de diferenciação entre os sorotipos das enterotoxinas, o desenvolvimento de resistência em animais a repetidas administrações, além do alto custo dos ensaios (PIMBLEY; PATEL, 1998).

Os ensaios imunológicos são bem mais simples e rápidos, além de sensíveis e específicos quando comparados com ensaios biológicos e, portanto, têm sido bastante utilizados. Estes testes fundamentam-se na capacidade da enterotoxinas, de interagir com anticorpos policlonais específicos, havendo assim, a formação de um precipitado (BERGDOLL, 1990). Porém, até o momento, só há *kits* imunológicos disponíveis comercialmente para detecção das enterotoxinas clássicas (SEA a SEE). Estes *kits* imunoenzimáticos são capazes de detectar as SE clássicas em fluidos sobrenadantes de culturas de *Staphylococcus* spp. e em extratos de alimentos, que em sua maioria, utilizam reações do tipo ELISA (E*nzyme-Linked Immunosorbent Assay*), LA (*Latex Agglutination*), RPLA (*Reversed Passive Latex Agglutination*) e ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) (PIMBLEY; PATEL, 1998).

Há, também, os métodos indiretos, os quais se fundamentam em técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polimerase Chain Reactor*) e suas variações. A PCR tem provado ser um instrumento muito útil como meio de diagnóstico para identificação de cepas de *Staphylococcus* spp. potencialmente enterotoxigênicas, pela procura de marcadores genéticos. No entanto, na técnica só é capaz de observar a presença dos genes nas cepas isoladas da amostra, sem indicar a produção das enterotoxinas, permitindo verificar a ocorrência não só dos genes das enterotoxinas clássicas, como também das mais recentemente descritas. Esta técnica é rápida, sensível, específica e confiável quando comparadas às metodologias tradicionalmente utilizadas para a identificação e diferenciação de micro-organismos (VASCONCELOS; CUNHA, 2010).

2.3. Detecção de *Staphylococcus* spp. Coagulase Positiva em Alimentos

A detecção de *Staphylococcus* spp. em alimentos é usualmente realizada pela utilização de métodos microbiológicos convencionais que visam a enumeração direta de colônias características desse micro-organismo, sem necessidade de uma etapa anterior de enriquecimento, em meios de cultura seletivos e diferenciais (AOAC, 1995), seguidos de testes de caracterização morfológica e bioquímica de colônias selecionadas por amostragem (LANCETTE; BENNETT, 2001).

Os métodos convencionais de análise microbiológica receberam essa denominação porque foram desenvolvidos há muitos anos, e desde então vêm sendo empregados internacionalmente como métodos oficiais na pesquisa de micro-organismos. Esses métodos estão descritos em publicações consideradas de referência, como o *Bacteriological Analytical Manual* (BAM), publicado em conjunto pela *Food and Drug Administration* (FDA) e *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC), o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, editado pela *American Public Health Association* (APHA) e o *Microorganisms in Foods – their significance and methods of enumeration*, publicado pela *International Commission on Microbiological Specificons for Foods* (ICMSF) (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

No Brasil, conforme a legislação vigente (ANVISA) destinada a uniformizar os padrões microbiológicos para práticas comerciais, a metodologia preconizada é aquela descrita pela APHA, que determina o isolamento ou enumeração de ECP dependendo do alimento. Em produtos que não é exigida a ausência deste grupo bacteriano, a tolerância para a sua presença varia entre 10^2 a $5x10^3$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/g ou mL de alimento (BRASIL, 2001).

A constante associação feita entre o potencial enterotoxigênico e capacidade de produção das enzimas coagulase e/ou termonuclease apenas por membros da espécie *S. aureus*, determinou a padronização de protocolos direcionados para essa bactéria (LANCETTE; BENNETT, 2001). Por isso, nos meios de cultura utilizados para a enumeração de ECP são empregadas várias substâncias inibitórias para o crescimento de espécies competitivas de *S. aureus*. As substâncias seletivas que são tóxicas para os demais micro-organismos mais frequentemente utilizadas nos meios de isolamento de *S. aureus* são o cloreto de sódio e o telurito de potássio. Várias

concentrações desses agentes têm sido utilizadas, variando de 5,5% a 10% de cloreto de sódio e de 0,0025% a 0,05% de telurito de potássio. Outras substâncias químicas como o sulfato de amônia, o ácido sórbico, a glicina, o cloreto de lítio e a polimixina são geralmente combinadas com os compostos anteriormente citados (LANCETTE; TATINI, 1992).

Além disso, outras características como a forma, aparência, pigmentação e o tamanho das colônias crescidas, a observação da morfologia, tamanho e característica de agregação das células bacterianas isoladas ao microscópio, bem como a capacidade de produção das enzimas catalase, coagulase e termonuclease, são constantemente pesquisadas na identificação de ECP, conforme os protocolos atuais. No entanto, a pesquisa de tais características é bastante controversa, uma vez que nem todas as espécies de ECP compartilham das mesmas características dos membros da espécie *S. aureus,* o que subestima a real quantidade de ECP nos alimentos analisados (LANCETTE; BENNETT, 2001), conforme é preconizado pela legislação brasileira (BRASIL, 2001).

2.3.1. Enumeração em Ágar *Baird-Parker*

O meio de cultura mais amplamente utilizado e recomendado para enumeração de ECP em alimentos é o ágar *Baird-Parker* (ABP) (SILVA et al., 2007). O ABP foi desenvolvido pelo pesquisador A. C. Baird-Parker, em 1962, a partir do meio de Zebovitz, Evans e Niven (1955) para recuperação e isolamento de estafilococos injuriados de alimentos. O meio, chamado inicialmente de ETPGA (do inglês *Egg-Tellurite-Pyruvate-Glycine-Agar*), foi modificado com alterações em sua composição, e ficou conhecido como "*Baird-Parker*" (BAIRD-PARKER, 1962).

Atualmente, o ABP é composto de telurito de potássio (0,01%) e cloreto de lítio (0,5%), que atuam como agentes seletivos, inibindo o crescimento da microbiota acompanhante, enquanto que o piruvato de sódio (1%) e a glicina (1,2%) atuam estimulando o crescimento de ECP. Adicionalmente, o meio contém gema do ovo, que juntamente com o piruvato de sódio são responsáveis pela regeneração de células injuriadas, uma vez que evita o acúmulo de peróxido de hidrogênio, produzido em

condições de aerobiose, que é toxico para as células. Suas características diferenciais baseiam-se na capacidade dos ECP de reduzir o telurito a telurito de potássio, o que confere as colônias coloração preta; e hidrolisar a gema do ovo, produzindo um halo claro ao redor da colônia de proteólise e uma zona opaca de lipólise (SILVA et al., 2007). As colônias também possuem, com frequência, uma borda interna de cor branca, produzida pela precipitação de ácidos graxos presentes no meio, devido à atividade lipolítica (LANCETTE; TANINI, 1992).

O ABP foi desenvolvido inicialmente para o isolamento apenas da espécie *S. aureus* (BAIRD-PARKER, 1962). No entanto, competidores e outras espécies do gênero não produtores de coagulase podem crescer neste meio, produzindo colônias semelhantes, havendo necessidade de submeter às colônias suspeitas, selecionadas por amostragem, a uma etapa posterior de caracterização através de provas bioquímicas adicionais como observação das características morfotintoriais pela coloração de Gram e avaliação da produção das enzimas catalase, coagulase e termonuclease (AOAC, 1995; SILVA et al., 2007).

O teste da produção da enzima coagulase livre é considerado padrão para a identificação de ECP e o teste da termonuclease é usado como auxiliar na discriminação da espécie *S. aureus* das demais (MENZIES, 1977). Entretanto, é preciso ressaltar que existem cepas atípicas de *S. aureus* que não produzem coagulase e/ou termonuclease (MATTHEWS et al., 1997), já que a produção de coagulase por *S. aureus* pode ser afetada adversamente por fatores físicos, como as condições de armazenamento, pH do meio e o dessecamento (LANCETTE e TATINI, 1992). Além do papel de identificação, esses testes também são considerados como indicadores indiretos da capacidade de determinada cepa isolada de produzir enterotoxinas (VICTOR et al., 1969), o que pode subestimar o número de cepas potencialmente enterotoxigênicas.

Apesar de serem bem estabelecidos e de requererem materiais de consumo geralmente mais baratos (LANTZ; HAHN-HÄGERDAL; RADSTRÓM, 1994), há inúmeras inconveniências na utilização dos métodos clássicos de cultivo microbiano para detecção de ECP em alimentos, como o tempo requerido para análise, que pode variar de três a seis dias, dependendo das etapas confirmatórias adicionais (AHMADI; ROHANI; AYREMLOU, 2010). Ademais, é consenso entre pesquisadores que a

metodologia convencional utilizada na enumeração de ECP possui limitações, como a baixa seletividade e a ocorrência de resultados imprecisos, estando sujeitas a erros, devido à necessidade de estimar a população de ECP com base na avaliação de uma amostragem das colônias com características de difícil visualização (DE BUYSYER, 1998; SCHOELLER; INGHAM, 2001).

Muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos na busca de métodos rápidos e confiáveis para a detecção de ECP potencialmente enterotoxigênicos em alimentos (SCHOELLER; INGHAM, 2001; SIRBENAGEL; JECHOREK; CAVER, 2003; GOMBOSSY et al., 2005; VIÇOSA et al., 2010; ZHANG et al., 2012). Esses métodos alternativos apresentam a vantagem de produzirem resultados mais rápidos, sensíveis e específicos, se comparados às técnicas convencionais. Tais métodos também podem oferecer economia de espaço e materiais, aumentando a produtividade laboratorial (SANT'ANA; CONCEIÇÃO; AZEREDO, 2005).

2.3.2. Sistema *Petrifilm™ Staph Express*

O sistema *Petrifilm™ Staph Express* (PSE) é um método oficial alternativo reconhecido pela AOAC (SILVA et al., 2007) para detecção rápida de *S. aureus* em alimentos. A placa PSE é um sistema pronto de meio de cultura, constituído por um filme duplo, onde o filme inferior é recoberto de nutrientes desidratados e géis hidrossolúveis a frio, enquanto, o filme superior contém agentes geleificantes e um corante indicador (JASSON et al., 2010).

O meio de cultura cromogênico é o *Baird-Parker* modificado, seletivo e diferencial para *S. aureus*, inibindo a proliferação das demais bactérias. O crescimento de colônias vermelho-violetas na placa é caracterizado como *S. aureus*. No entanto, pode ocorrer o crescimento de colônias azul esverdeada que são indicativas da microbiota contaminante, e colônias com coloração preta, sendo necessário o uso do disco *Petrifilm™ Staph Express*. Este disco é composto por um indicador, o azul de toluidina, e DNA, que na presença de cepas produtoras de DNAse, esse DNA é degradado em oligonucleotídeos e há reação com o azul de toluidina formando halos rosados ao redor da colônia suspeita, indicando presença de *S. aureus*, e

ocasionalmente *S. hyicus* e *S. intermedius*. A utilização do PSE exclui a necessidade de realização de testes bioquímicos adicionais, como o teste da coagulase, simplificando a análise com redução do trabalho laboratorial e permitindo o processamento de maior número de amostras em menor período de tempo (3M, 2005).

A amostra processada é inoculada na superfície do filme inferior, e então o filme superior é sobreposto. Com o auxílio de um difusor plástico, o inoculo é espalhado ao longo do petrifilm reidratando os nutrientes e reconstituindo o meio. Após solidificação da substância geleificante, o petrifilm está pronto para ser incubado na temperatura e tempo indicados pelo fabricante. Em seguida, as colônias características são enumeradas e o resultado é expresso em UFC/g ou mL (NERO et al., 2000).

Em vários trabalhos o PSE já foi analisado como uma alternativa à metodologia convencional (INGHAM; BECKER; FANSLAU, 2003; MCMAHON et al., 2003; SIRBENAGEL; JECHOREK; CAVER, 2003; GOMBOSSY et al., 2005; SILVA et al., 2005; FEDIO et al., 2008; VIÇOSA et al., 2010; ZHANG et al., 2012).

As principais vantagens das placas PSE em relação ao método convencional é que são simples de utilizar, de tamanho reduzido, com longa vida de prateleira (FUNG, 2002), e estão prontas para uso, eliminando as etapas de preparação dos meios de cultura e vidrarias necessárias para as análises (FRANCO; BELOTI, 1990). Além disso, os resultados são mais conclusivos e de fácil leitura, reduzindo as chances de erros comuns nos métodos convencionais de plaqueamento, com menor tempo de análise (3M, 2015).

2.4. Comida Japonesa e o Consumo do Pescado Cru

A culinária japonesa tem como destaque pratos à base de pescado cru (MIRANDA; BAIÃO, 2011), anteriormente consumidos somente em países orientais. No entanto, nas últimas décadas o mundo tem presenciado um acelerado processo de globalização nos costumes e hábitos alimentares, que associado à busca de alimentos mais saudáveis e à oferta de pescado de qualidade no mercado nacional,

levou a introdução e rápida difusão desse tipo de alimentação no Brasil (PINHEIRO et al., 2006; GERMANO; GERMANO, 2014).

O *sushi* é uma iguaria tradicional da culinária oriental preparada com peixe cru, principalmente o salmão (*Salmo salar*), ou outros frutos do mar combinado com arroz cozido temperado com vinagre, açúcar e sal (KIM; YUN; RHEE, 2011). Esta preparação é conhecida como *niguiri-sushi*, mas é tradicionalmente chamada no ocidente apenas de *sushi.* Outra preparação também bastante consumida é o *sushi* envolto com alga (*Porphyra* sp.) marinha desidratada, chamada de m*aki-sushi*, sendo apresentadas de diferentes maneiras com vegetais, legumes, frutas, *cream cheese*, entre outros ingredientes (ATANASSOVA; REICH; KLEIN, 2008); e ainda, o *sashimi* que consiste em fatias de peixes ou outros frutos do mar servidas cruas.

As preparações à base de pescado cru são recentes nos estabelecimentos de alimentação nas cidades brasileiras. Os restaurantes especializados na gastronomia japonesa, anteriormente restritos a regiões onde predominavam imigrantes asiáticos, tornaram-se comuns em diversos bairros, estando presentes em quase todos os *shoppings*, dentro da categoria *fast-food*, existindo, até mesmo, na modalidade de entrega a domicílio (GERMANO; GERMANO, 2014). Tais preparações são também encontradas em estabelecimentos não especializados na culinária oriental, sendo muitas das vezes preparados com os mesmos utensílios e pelos mesmos funcionários que manipulam os demais alimentos, levando ao risco de contaminação cruzada. Além disso, os estabelecimentos nem sempre oferecem adequadamente o alimento, no que se refere à temperatura, local e tempo de exposição (MARTINS, 2006).

O pescado cru em seu estado fresco ou refrigerado, reúne características intrínsecas necessárias ao desenvolvimento e sobrevivência de inúmeras bactérias, como o pH próximo à neutralidade, elevada atividade de água (igual ou superior a 0,98) e alto teor de nutrientes (ICMSF, 1983). A microbiota normal dos peixes é geralmente encontrada no muco interno, nas guelras e no intestino, estando diretamente relacionado com o ambiente de criação (SOUZA, 2003). Os tecidos internos de um peixe saudável são estéreis, e a presença de micro-organismos nestes é indício de contaminação pós captura, durante o processamento (CARDOSO et al., 2003).

Entre os micro-organismos patogênicos de maior ocorrência em pescados crus e suas preparações, destacam-se: *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus, S. aureus* e *Salmonella* sp., e a pesquisa destas bactérias é obrigatória na avaliação da qualidade microbiológica de tais alimentos, conforme a legislação brasileira (BRASIL, 2001).

A presença de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, principalmente *S. aureus*, em *sashimi, sushi* e suas variações é frequentemente relatada em diversos estudos (MARTINS, 2006; VIEIRA et al., 2007; SANTOS et al., 2012; CARMO et al., 2013). A manipulação excessiva dos peixes *in natura* na preparação e montagem dos pratos por manipuladores de alimentos sem treinamento adequado e com precárias condições de higiene, aliado a ausência de processo térmico, como a cocção, leva ao aumento da incidência de destas bactérias, representando riscos para a saúde dos consumidores (JAY, 2005).

Estima-se que 20 a 50% de humanos adultos saudáveis sejam portadores assintomáticos de *S. aureus*, e por estas razões, os manipuladores de alimentos constituem o veículo de contaminação mais frequente deste micro-organismo (LE LOIR et al., 2003). Além disso, já foi demonstrado que 30 a 50% de cepas presentes em humanos são potencialmente enterotoxigênicas (BERGDOLL, 1989; ICMSF, 1996; JABLONSKI; BOHACH, 2001).

Recentemente, Kim, Yun e Rhee (2011), em estudo sobre a prevalência de *S. aureus* em *sushi* na Coréia, isolaram 110 cepas desta espécie, de 1.882 amostras analisadas, e avaliaram o potencial enterotoxigênico. Entre os *S. aureus* isolados, 45,45% (50/110) possuíam um ou mais genes das enterotoxinas SEA, SEG, SEH, SEI, SE/J, reafirmando o potencial risco pela contaminação de ECP em tais alimentos.

A preocupação constante dos órgãos ligados à Saúde Pública devido o crescente consumo desse tipo de alimento, se deve pelo fato de ser um produto altamente perecível, consumido cru e ligeiramente resfriado e, principalmente, pelos aspectos higiênico-sanitários envolvidos em sua preparação e conservação, exigindo conhecimentos e cuidados durante o processamento (VIEIRA et al., 2007). Dessa forma, medidas de segurança alimentar tornam-se imprescindíveis, devendo ser estabelecidas etapas e procedimentos ao longo da cadeia produtiva, desde o recebimento das matérias-primas até a elaboração do produto final, baseadas nas

normas estabelecidas pela legislação vigente, como adoção Boas Práticas de Fabricação (BPF) e implementação da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (SEIXAS et al., 2008; MIRANDA; BAIÃO, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar o sistema *Petrifilm™ Staph Express* na enumeração de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva de comida japonesa.

3.2. Objetivos Específicos

- Comparar os resultados dos ensaios microbiológicos do PSE com a metodologia convencional, o ABP, na enumeração de ECP de duas preparações à base de pescado cru da culinária japonesa;

- Correlacionar as características morfológicas das colônias isoladas do PSE e ABP com a produção das enzimas coagulase, DNAse e termonuclease;

- Avaliar a qualidade microbiológica das preparações à base de pescado cru da culinária japonesa analisadas pela pesquisa de ECP e comparar com parâmetros de qualidade pré-estabelecidos pela legislação vigente para este micro-organismo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras de Comida Japonesa

As preparações da culinária japonesa à base de pescado cru selecionadas para a pesquisa foram:

- ***Sushi*:** arroz temperado combinado com salmão;
- ***Filadélfia*:** arroz temperado recheado com salmão, cebolinha e *cream cheese*, envolto por alga marinha desidratada, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Preparações à base de pescado cru selecionadas para o estudo.
Fonte: SOUZA, 2015.

O estudo foi realizado com 60 unidades amostrais: 30 unidades de *sushi* e 30 unidades de *filadélfia*. As amostras foram adquiridas de dois restaurantes especializados na culinária japonesa com sistema de bufê (A) e *à la carte* (B), localizados na Ilha do Fundão na cidade do Rio de Janeiro (RJ).

O período de coleta das amostras compreendeu cinco semanas, de janeiro a maio de 2015. A coleta das amostras foi sempre realizada no horário do almoço, de 10 às 12 h, acondicionadas em caixa isotérmica, de forma a conservar a temperatura de exposição, até a chegada ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos na Escola de Química (EQ) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), onde foram mantidas sob refrigeração em até 3 h para a realização das análises microbiológicas no ABP e PSE simultaneamente.

4.2. Preparação das Amostras e Diluições

As amostras foram analisadas de acordo com a metodologia proposta pela APHA no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, recomendado para alimentos em que se espera contagens de ECP acima de 100 UFC/g (APHA, 2001). Cada unidade amostral foi transferida para sacos estéreis (Whirl-Pak®, EUA) e pesada em condições assépticas, para posterior homogeneização em volume necessário de água peptonada tamponada (BPW, do inglês *Buffered Peptone Water*) (Difco®, França), no homogeneizador de amostras (MK124, Boitton®) por 60 s, para realização da diluição 10^{-1}. As demais diluições seriadas foram obtidas a partir da adição de 1 mL da diluição anterior em 9 mL do mesmo diluente do homogeneizado (MIDURA; BRYANT, 2001).

4.3. Medição de pH

O pH das amostras foi medido pelas fitas indicadoras de pH-FIX 0-14 (Macherey-Nagel®, Alemanha). Nas diluições 10^{-1} de cada unidade amostral foi adicionada uma fita, e após alguns segundos, o pH foi determinado pela comparação da coloração da fita com o manual do fabricante.

4.4. Enumeração de *Staphylococcus* spp. Coagulase Positiva

4.4.1. Plaqueamento em Ágar *Baird-Parker*

O ABP (Difco®, França), acrescido de emulsão de gema de ovo e telurito de potássio (Laborclin®, Brasil), foi preparado conforme as instruções do fabricante e disposto em placas de Petri, em volume de 15-20 mL. As placas foram deixadas em repouso até a completa solidificação do meio para a realização das análises (LANCETTE; BENNETT, 2001).

As placas com ABP foram semeadas, em duplicata, com 0,1 mL das diluições das amostras e o inóculo espalhado com auxílio de uma alça de *Drigalski* estéril, para

posterior incubação à 35-37 °C por 48 h. Após este período, foram selecionadas para a contagem placas da mesma diluição com 20 a 200 colônias presuntivas de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva: colônias pretas, circulares, brilhantes, lisas, convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçadas nas bordas e rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente, conforme ilustrado na Figura 2. Na ausência de colônias típicas, também foram contados os diferentes tipos de colônias (atípicas) crescidas no meio (LANCETTE; BENNETT, 2001).

Figura 2. Colônias típicas de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva em ágar *Baird-Parker*.
Fonte: BIOMÉRIEUX, 2015.

Em seguida, cinco colônias entre típicas e/ou atípicas foram selecionadas, semeadas em tubos contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (HiMedia®, Índia) e incubadas à 35-37 °C por 24 h. Quando observado menos de cinco colônias de mesma característica, todas foram tomadas. Na sequência, as culturas foram semeadas em tubos contendo *Trypticase Soy Agar* (TSA) (HiMedia®, Índia) inclinado e incubadas à 35-37 °C por 24 h, para posterior confirmação das cepas isoladas através dos testes bioquímicos (LANCETTE; BENNETT, 2001), conforme representado na Figura 3.

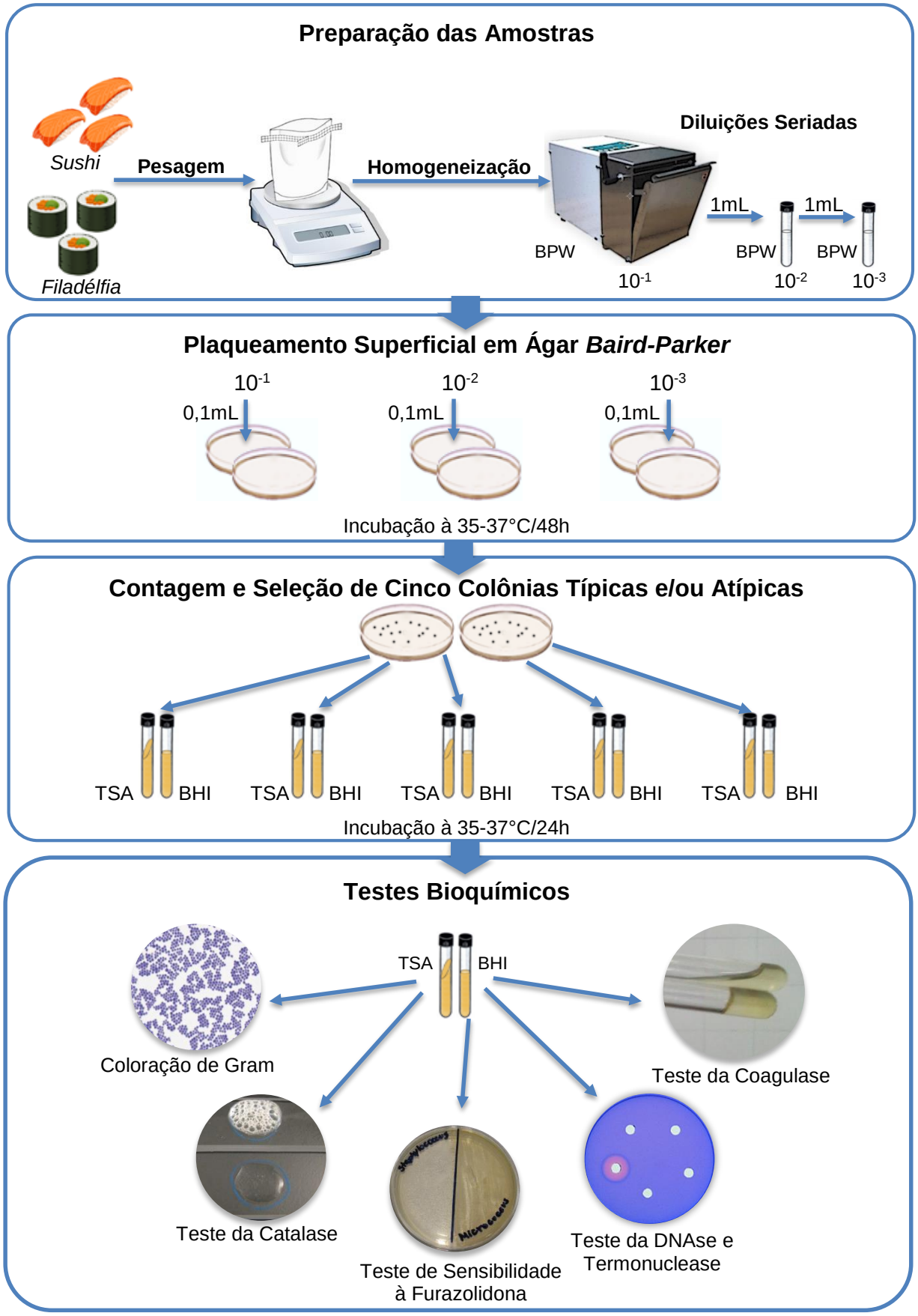

Figura 3. Representação esquemática da enumeração de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva pela metodologia convencional (ágar *Baird-Parker*).
Fonte: SILVA et al., 2007 (modificado).

4.4.1.1. Coloração de Gram

Após o crescimento das culturas em tubos com TSA inclinado, foi preparado um esfregaço em lâminas de microscopia previamente limpas para a coloração de Gram. Os reagentes (Laborclin®, Brasil) foram depositados sobre o esfregaço em tempos determinados, e na sequência, as lâminas foram visualizadas no microscópio óptico. A visualização de bactérias esféricas, com agrupamento irregular em forma de cachos e coloração roxa é característica do gênero *Staphylococcus* (LANCETTE; BENNETT, 2001).

4.4.1.2. Teste da Catalase

Uma alçada de crescimento bacteriano dos tubos com TSA inclinado foi transferida para a superfície de uma lâmina de vidro de microscopia previamente limpa, a fim de observar a capacidade das cepas isoladas de produzir a enzima catalase. A adição de gotas de solução de peróxido de hidrogênio (Vetec®, Brasil) a 3 % (v/v) sobre a cultura com ocorrência de borbulhamento imediato devido ao desprendimento do oxigênio, indica teste positivo, característico de *Staphylococcus* spp. (LANCETTE; BENNETT, 2001).

4.4.1.3. Teste da Coagulase

A partir dos tubos de caldo BHI com cultivo bacteriano, foram transferidas alíquotas de 0,1 mL para tubos de 10x100 mm estéreis, e em seguida, foram adicionados 0,3 mL de Coagulase-Plasma-EDTA (Laborclin®, Brasil), hidratado segundo instruções do fabricante e misturados com leves movimentos rotatórios, sem forte agitação, para não haver interferência na coagulação. Os tubos foram incubados à 35-37 °C por um período máximo de 24 h, para a observação das cepas isoladas com habilidade de produção da enzima coagulase livre. As culturas com nítida formação de coágulo nos níveis 3+ e 4+ (Figura 4) foram consideradas como reações positivas. As culturas com formação de coágulo nos níveis 1+ e 2+ (Figura 2) foram submetidas ao teste da termonuclease para confirmação (LANCETTE; BENNETT, 2001).

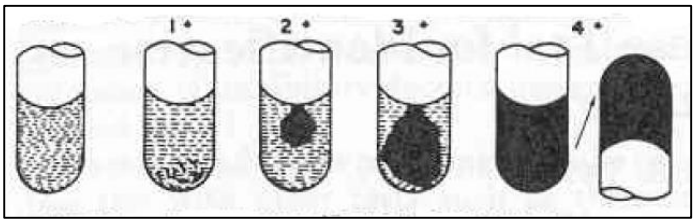

Figura 4. Reações do teste da coagulase.
Fonte: SPERBER; TATINI, 1975.

4.4.1.4. Teste da DNAse e Termonuclease

As culturas crescidas em BHI tiveram alíquotas de 20 µL transferidas para orifícios de 5 mm previamente preparados em placas com ágar azul de toluidina DNA (HiMedia®, Índia), que foram incubadas à 35-37 °C por 24 h para a observação da produção da enzima DNAse. Em seguida, tais tubos contendo o cultivo bacteriano foram submetidos à 100 °C em banho-maria (Q334M-18, Quimis®) por 15 min, para ativação de nucleases termorresistentes, e então, 20 µL das culturas foram transferidas para os orifícios de placas com ágar azul de toluidina DNA e incubadas à 35-37 °C por 4 h. A formação de halos de coloração rosa que se estenderam por 1 mm além do orifício, devido a degradação do DNA, foi considerado resultado positivo para ambos os testes (LANCETTE; BENNETT, 2001).

4.4.1.5. Teste de Sensibilidade à Furazolidona

As culturas previamente caracterizadas como *Staphylococcus* spp. foram submetidos ao teste de susceptibilidade ao antibiótico furazolidona, segundo Von Rheinbaben e Hadlok (1981), para a diferenciação das bactérias do gênero *Staphylococcus* de outros cocos Gram positivos, catalase positivos e coagulase negativos. Uma alçada das cepas isoladas cultivadas em caldo BHI foram semeadas em placas de ágar a base de peptona (HiMedia®, Índia) e glicose (Vetec®, Brasil) adicionado de 20 µg/mL de furazolidona (Vetec®, Brasil) e incubadas à 35-37 °C por 18-24 h. As culturas sensíveis ao antibiótico não crescem no meio, e são confirmadas como *Staphylococcus* spp. (KLOOS; SCHLEIFER, 1986).

4.4.1.6. Cálculo dos Resultados

Os resultados de enumeração de ECP no ABP foram expressos em UFC/g procedendo se com os seguintes cálculos e correções, a partir das colônias isoladas (LANCETTE; BENNETT, 2001), segundo fórmula descrita por Pereira, 2006:

$$\text{Número de } \textit{Staphylococcus} \text{ spp. coagulase positiva} = \frac{ECP}{CI} \times CT \times ID \times FC$$

Onde:

ECP = número de cepas confirmadas como ECP isoladas do ABP (≤5);

CI = número de colônias isoladas de meio BP (≤5);

CT = contagem total de colônias típicas crescidas no ABP;

ID = inverso da diluição em que fora feita a contagem;

FC = fator de correção.

Na ausência de crescimento de cepas de ECP, o resultado da enumeração foi expresso como inferior ao limite de detecção do método (< 100 UFC/g).

4.4.2. Plaqueamento em *Petrifilm ™ Staph Express*

As placas de PSE (3M® Food Safety, EUA) foram semeadas, em duplicata, conforme as instruções do fabricante. Para a inoculação, o filme superior do PSE foi levantado e 1 mL das diluições das amostras foi adicionado no centro da placa, e em seguida, o filme foi abaixado lentamente sobre a amostra para evitar a formação de bolhas de ar. Imediatamente após este procedimento, o difusor plástico (3M® Food Safety, EUA) foi colocado sobre o centro da placa e levemente pressionado para espalhamento uniforme do inóculo. As placas de PSE foram deixadas em repouso por alguns minutos para a solidificação do gel, e então incubadas à 35-37 °C por 24 h na posição horizontal, com o lado transparente das placas para cima, em pilhas de até 20 placas. Na ausência de crescimento após 24 h, as placas foram deixadas na estufa por mais 2 h (3M, 2005).

Após o período de incubação, foram selecionadas placas de PSE com até 150 colônias vermelho-violetas para a contagem, conforme ilustrado na Figura 5. Se apenas estas colônias cresceram no PSE, foram contadas como *S. aureus* e o teste foi concluído.

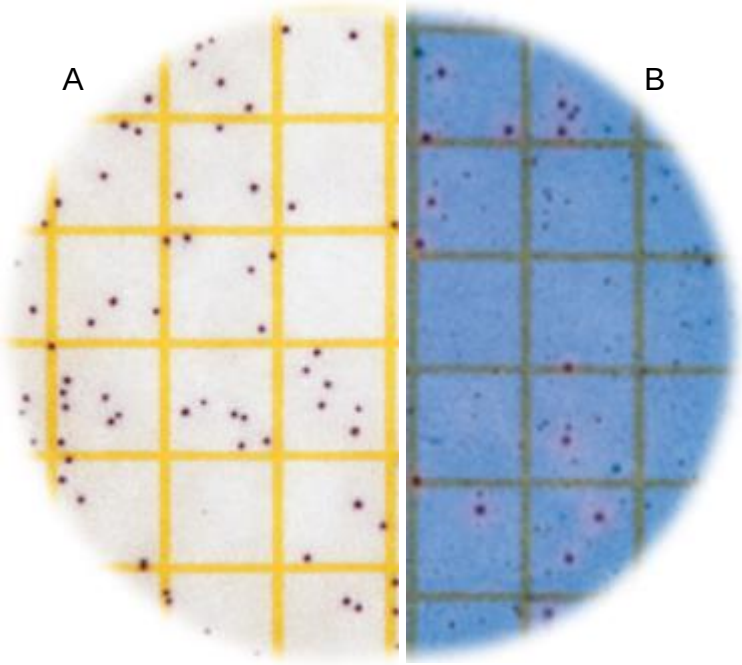

Figura 5. Colônias típicas de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva no *Petrifilm™ Staph Express* (A) e reação positiva do uso do disco *Petrifilm™ Staph Express* (B).
Fonte: 3M, 2005.

Na presença de colônias com outra coloração, foi utilizado o disco indicador de DNA com azul de toluidina (3M® Food Safety, EUA), em pelo menos uma das placas selecionadas para a contagem, as quais foram novamente incubadas à 35-37 °C por 1-3 h. A presença de halo rosado nas colônias, devido à degradação do DNA, é indicativo de *S. aureus*, mas também podem ser outros ECP (Figura 5) (3M, 2005).

O resultado foi determinado pela multiplicação da média de colônias contadas como ECP pelo inverso da diluição que foi feita a contagem, e expresso em UFC/g, conforme determinado pelas instruções do fabricante.

A fim de verificar se as colônias presuntivas de ECP são de fato pertencentes deste grupo bacteriano, três colônias típicas e/ou atípicas, correspondentes a uma semana, foram selecionadas e semeadas em caldo BHI e TSA inclinado, com

incubação à 35-37 °C por 24 h para posterior confirmação das cepas pelas provas bioquímicas: coloração de Gram e testes da catalase, coagulase, DNAse, termonuclease e sensibilidade à furazolidona. O resultado final em UFC/g foi dado pelas correções de colônias típicas e atípicas confirmadas, e na ausência de cepas de ECP, o resultado da enumeração foi expresso como inferior ao limite de detecção do método (< 10 UFC/g).

4.5. Controle

Em todos os ensaios e testes bioquímicos foi utilizada como controle positivo a cepa de *S. aureus American Type Culture Collection* (ATCC) 6538 e como controle negativo as cepas de *E. coli* ATCC 8739 e *Micrococcus luteus* ATCC 4698, este último apenas para o teste de sensibilidade à furazolidona.

4.6. Análise Estatística

A Análise de Variância (ANOVA, do inglês *Analysis of Variance*) com dois fatores foi aplicada aos dados experimentais obtidos (WONNACOTT; WONNACOTT, 1969; MONTGOMERY; RUNGER, 2002), com o objetivo de averiguar equivalência do PSE e ABP na enumeração de ECP nas diferentes semanas.

O grau de correlação entre as frequências das diferentes características morfológicas das colônias (típicas e atípicas) isoladas do PSE e ABP que apresentaram resultados confirmados e não confirmados pelos testes bioquímicos foram analisadas pela tabela de contingência (WONNACOTT; WONNACOTT, 1969; MONTGOMERY; RUNGER, 2002).

O nível de significância assumido foi de 5% em todo trabalho e, portanto, só foi considerado significativo valores-p < 0,05. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *Microsoft Excel.*

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Comparação entre o *Petrifilm™ Staph Express* e o Ágar *Baird-Parker* na Enumeração de *Staphylococcus* spp. Coagulase Positiva em Preparações à base de Pescado Cru da Culinária Japonesa

O pH de todas as 60 unidades amostrais de *sushi e filadélfia* foi neutro (6-7), e é apresentado no Apêndice A.

A análise estatística das médias das contagens de ECP no PSE e no ABP das amostras de *sushi* e *filadélfia* analisadas dos restaurantes A e B durante as cinco semanas são apresentadas na Tabela 1, onde os cálculos realizados para as contagens seguem os protocolos determinados por cada método.

Tabela 1. Média e desvio padrão das contagens de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva no *Petrifilm™ Staph Express* e ágar *Baird-Parker* das amostras de *sushi* e *filadélfia* dos restaurantes A e B, nas diferentes semanas e seus valores-p de comparação.

Semana	Média das Contagens ± Desvio Padrão (UFC/g)		Valor-p
	Petrifilm™ Staph Express	**Ágar *Baird-Parker***	
1	$1{,}10 \times 10^2 \pm 8{,}30 \times 10^1$	< 100	0,001*
2	$7{,}32 \times 10^2 \pm 1{,}14 \times 10^3$	$8{,}30 \times 10^0 \pm 2{,}80 \times 10^1$	0,014*
3	$3{,}94 \times 10^2 \pm 4{,}41 \times 10^2$	< 100	0*
4	$2{,}91 \times 10^1 \pm 7{,}07 \times 10^1$	$5{,}83 \times 10^2 \pm 1{,}98 \times 10^3$	0,350
5	$4{,}58 \times 10^1 \pm 4{,}43 \times 10^2$	$5{,}15 \times 10^2 \pm 1{,}43 \times 10^2$	0,001*

* Apresenta diferença significativa.

No PSE as médias das contagens de ECP nas diferentes semanas variaram de $2{,}91 \times 10^1$ a $7{,}32 \times 10^2$ UFC/g, enquanto no ABP houve variação de < 100 a $5{,}83 \times 10^2$ UFC/g. A análise dos dados indicou da diferença significativa ($p < 0{,}05$) entre o PSE e ABP na enumeração de ECP nas semanas 1, 2, 3 e 5 (Tabela 1).

Apenas na semana 4 as médias das contagens não apresentaram diferença significativa ($p > 0{,}05$) (Tabela 1), devido à homogeneidade entre os resultados. Ambas metodologias detectaram ECP em somente duas unidades amostrais, o que explica a similaridade estatística dos dados, embora só tenha ocorrido correspondência em uma unidade amostral de *filadélfia* do restaurante B. Vale lembrar

que as médias das contagens foram obtidas a partir dos diferentes produtos. Enquanto o PSE revelou contaminação por ECP apenas nas amostras de *filadélfia*, o ABP encontrou tais bactérias também no *sushi* deste mesmo restaurante, e esta foi a única unidade amostral que divergiu dos resultados do PSE. Para uma consulta mais detalhada, as contagens realizadas em todas as amostras dos restaurantes A e B são apresentadas nos Apêndices B e C, respectivamente.

A literatura possui muitos trabalhos onde pesquisadores já demonstraram similaridade entre as metodologias comparadas neste estudo nos mais variados tipos de alimentos (INGHAM; BECKER; FANSLAU, 2003; MCMAHON et al., 2003; SIRBENAGEL; JECHOREK; CAVER, 2003; GOMBOSSY et al., 2005; SILVA et al., 2005; FEDIO et al., 2008; VIÇOSA et al., 2010; ZHANG et al., 2012).

Em amostras de salmão defumado artificialmente contaminados com *S. aureus*, McMahon et al. (2003) durante um estudo colaborativo, compararam o PSE com o ABP e relataram que as contagens de ECP em ambas metodologias não foram significativamente diferentes, assim como as variâncias de repetibilidade e reprodutibilidade dos métodos.

Recentemente, outro estudo comparativo e interlaboratorial também avaliou estes métodos oficiais para enumeração de ECP em diferentes alimentos, inclusive no peixe cru, naturalmente e artificialmente contaminados com as espécies *S. aureus, S. hyicus* e *S. intermedius*. Os pesquisadores verificaram que no PSE os resultados foram precisos e comparáveis ao ABP, permitindo a detecção de todas as espécies de ECP estudadas (AFNOR, 2015).

Durante as análises, foi observado que o PSE teve a maior capacidade de recuperação de colônias presuntivas de ECP, em comparação com o ABP, embora tal método também tenha possibilitado o desenvolvimento de colônias com diferentes características morfológicas, assim como o ABP. No PSE foi verificado o crescimento de colônias violetas, pretas e azuis, conforme ilustrado na Figura 6.

Nas instruções do fabricante (3M, 2005), há determinação da contagem somente de colônias vermelho-violeta como *S. aureus* e possivelmente outros ECP, como *S. hyicus* e *S. intermedius*, estando a análise concluída se houver apenas o crescimento desse tipo de colônia. No entanto, colônias vermelho-violeta não foram

observadas neste estudo e, então, as colônias violetas foram tidas como colônias típicas suspeitas de ECP. As colônias violetas nem sempre eram facilmente diferenciadas das colônias pretas, caracterizadas como colônias atípicas (Figura 6), dificultando a análise. Esta diferenciação é importante, visto que as colônias pretas quando presentes no PSE requerem a utilização disco *Petrifilm™ Staph Express*, para inferir se tais colônias são de fato ECP. Tal disco é vendido separadamente, elevando os custos da análise. As colônias azuis, de acordo com o fabricante (3M, 2005), indicam uma microbiota contaminante e não devem ser contadas ou isoladas durante análise de ECP.

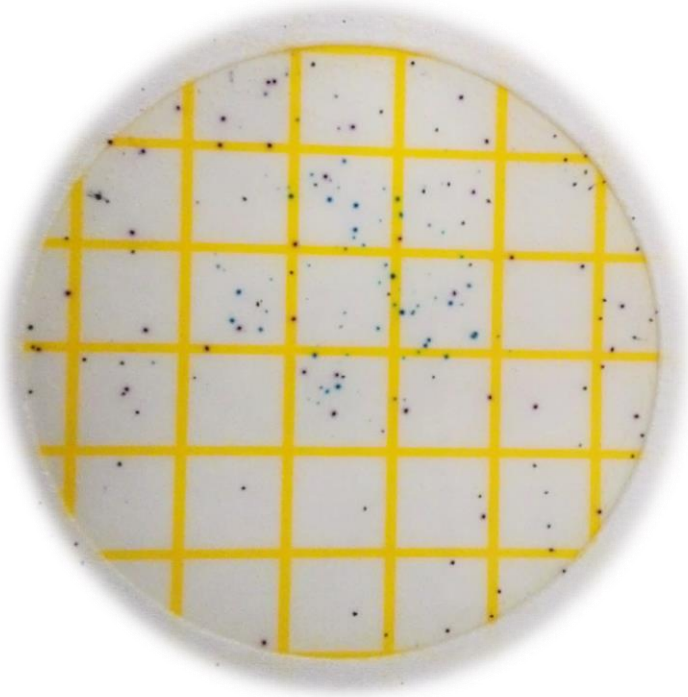

Figura 6. Diferentes tipos de colônias crescidas no PSE.
Fonte: SOUZA, 2015.

O critério de interpretação do PSE através da coloração das colônias deve ser revisto pelo fabricante, a fim de evitar confusões pelos profissionais da área durante a utilização deste método, e caracterizar uma vantagem do PSE perante o ABP que é constantemente criticado pela dificuldade na leitura das colônias que devem ser selecionadas para estimar a quantidade de ECP em alimentos (DE BUYSYER, 1998; SCHOELLER; INGHAM, 2001).

Conforme a metodologia convencional (LANCETTE; BENNETT, 2001), as colônias típicas de ECP devem ser pretas, circulares, brilhantes, lisas, convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçadas nas bordas, e principalmente, rodeadas por uma zona opaca de atividade lipolítica e/ou halo transparente de proteólise e que se estende para além da zona opaca. Tais características nem sempre foram observadas durante as análises, conforme demonstrado na Figura 7.

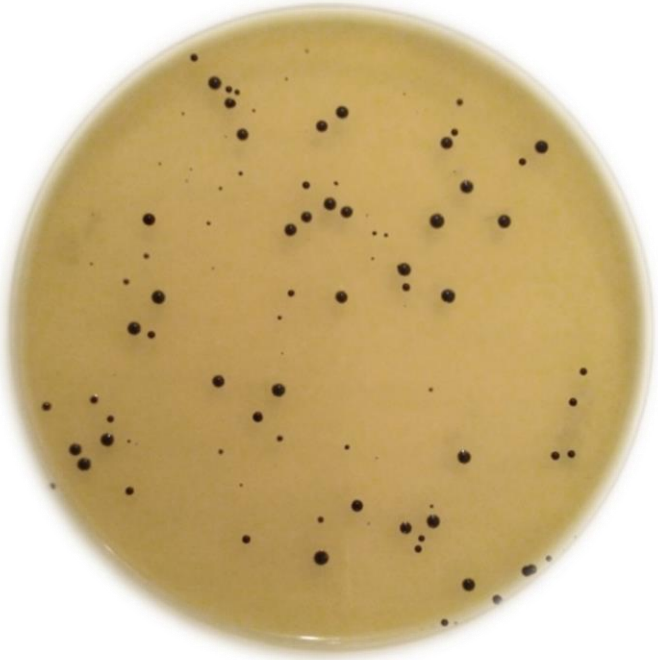

Figura 7. Diferentes tipos de colônias crescidas no ABP.
Fonte: SOUZA, 2015.

Embora o ABP tenha sido desenvolvido para recuperar células viáveis e injuriadas de *S. aureus*, este meio possui imprecisões na seleção de colônias típicas pela dificuldade de visualização da zona opaca e do halo de transparência (Figura 7). Além disso, algumas cepas de *S. aureus* não são lipolíticas e/ou proteolíticas e crescem produzindo colônias atípicas (sem tais características), considerando-se a importância do isolamento de colônias típicas e atípicas para posterior caracterização através de testes bioquímicos adicionais (BAIRD-PARKER, 1990).

A frequência dos diferentes tipos de colônias crescidas no PSE e no ABP referentes a diluição 10^{-1} de todas as semanas é demonstrada na Figura 8. Do total de 120 placas de PSE foi observado crescimento de pelo menos um tipo de colônia

em todas as placas, com 70% (84/120) das placas apresentando colônias típicas, 90% (108/120) das placas apresentando colônias atípicas e 88,33% (106/120) das placas apresentando colônias com outras características (coloração azul), que indicam contaminantes. No ABP, das 120 placas, 18,33% (22/120) das placas não apresentaram crescimento de nenhuma colônia, e em 81,66% (98/120) das placas houve crescimento de colônias, sendo estas típicas em 52,04% (51/98), atípicas em 66,32% (65/98), e com outras características (coloração branca) em apenas 2,04% (3/98) das placas (Figura 8).

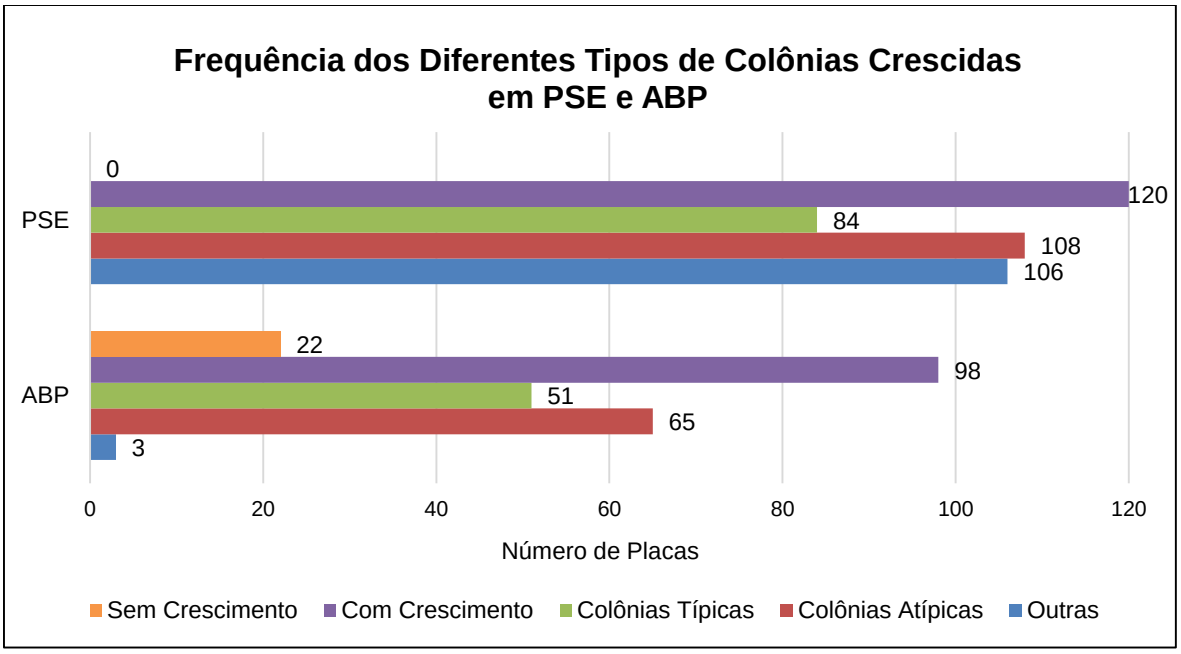

Figura 8. Frequência dos diferentes tipos de colônias crescidas no PSE e ABP.

Apesar do PSE ter possibilitado o crescimento de um maior número de colônias típicas de ECP (70%), quando comparado com o ABP (52,04%), também possibilitou o crescimento da microbiota acompanhante em 88,33% das placas, o que dificulta a enumeração e isolamento de ECP, requerendo maior número de diluições seriadas e aumentando, dessa forma, o trabalho laboratorial, volume de material e consequentemente, os custos com as análises.

Ingham, Becker e Fanslau (2003) também verificaram elevada frequência de placas de PSE que apresentaram crescimento da microbiota concomitante,

representada por colônias de outras cores que não vermelho-violeta, ao compararem o PSE com o ABP na enumeração de *S. aureus* em amostras de carne de ave e leite naturalmente contaminadas.

As placas de PSE da mesma diluição com até 150 colônias típicas foram selecionadas para a contagem de ECP (3M, 2005). Adicionalmente, destas placas foram isoladas até três colônias suspeitas para investigar se eram efetivamente ECP, por meio dos testes bioquímicos adicionais descritos pela metodologia convencional (LANCETTE; BENNETT, 2001). Tal caracterização não consta nas instruções do PSE (3M, 2005). Na presença de colônias atípicas e na ausência de colônias típicas, foi usado o disco *Petrifilm™ Staph Express* (3M, 2005), porém não foi observada a formação do halo róseo. Logo, o resultado da contagem de ECP em placas apenas com as colônias atípicas foi expresso como < 10 UFC/g, e, ainda assim, estas colônias foram isoladas.

Em relação as placas com ABP, a metodologia convencional (LANCETTE; BENNETT, 2001) preconiza seleção de placas da mesma diluição com 20 a 200 colônias típicas e isolamento de cinco colônias sugestivas de ECP. Quando foi observado menos de cinco colônias, todas foram isoladas, e na presença de diferentes colônias, ambas foram selecionadas para as provas bioquímicas.

Um total de 150 colônias foram isoladas do PSE, sendo 111 colônias típicas e 39 colônias atípicas; e 210 colônias foram isoladas do ABP, sendo 95 colônias típicas e 115 colônias atípicas. Inicialmente, todas as colônias isoladas de ambos os métodos foram submetidas à coloração de Gram. As frequências das características morfotintoriais das colônias isoladas no PSE e no ABP são apresentadas nas Figuras 9 e 10, respectivamente.

No PSE, 90,09% (100/111) das colônias típicas foram caracterizadas como cocos Gram-positivos e as demais colônias (11/111) como bastonetes Gram-negativos. Em relação às colônias atípicas, 94,87% (37/39) foram caracterizadas como cocos Gram-positivos e 5,13% (2/39) como leveduras (Figura 9).

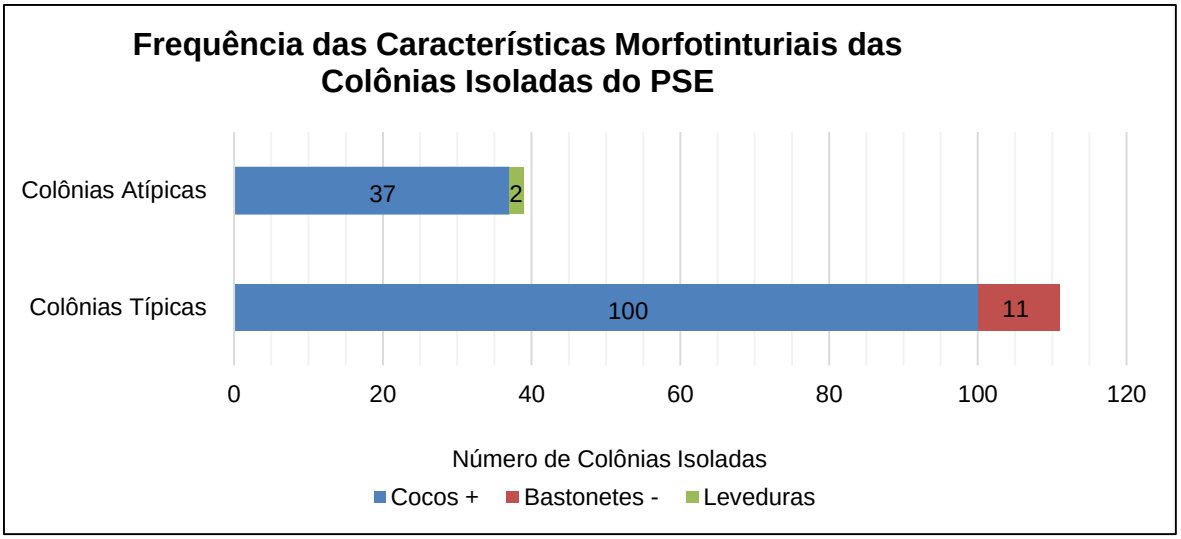

Figura 9. Frequência das características morfotintoriais das colônias isoladas do PSE.

No ABP, 92,63% (88/95) das colônias típicas foram caracterizadas como cocos Gram-positivos e 7,37% (7/95) como bastonetes Gram-negativos. Contudo as colônias atípicas foram observadas como cocos Gram-positivas em 90,43% (104/115), bastonetes Gram-positivas em 3,48% (4/115), bastonetes Gram-negativas em 0,87% (1/115) e leveduras em 5,22% (6/115) das colônias isoladas (Figura 10).

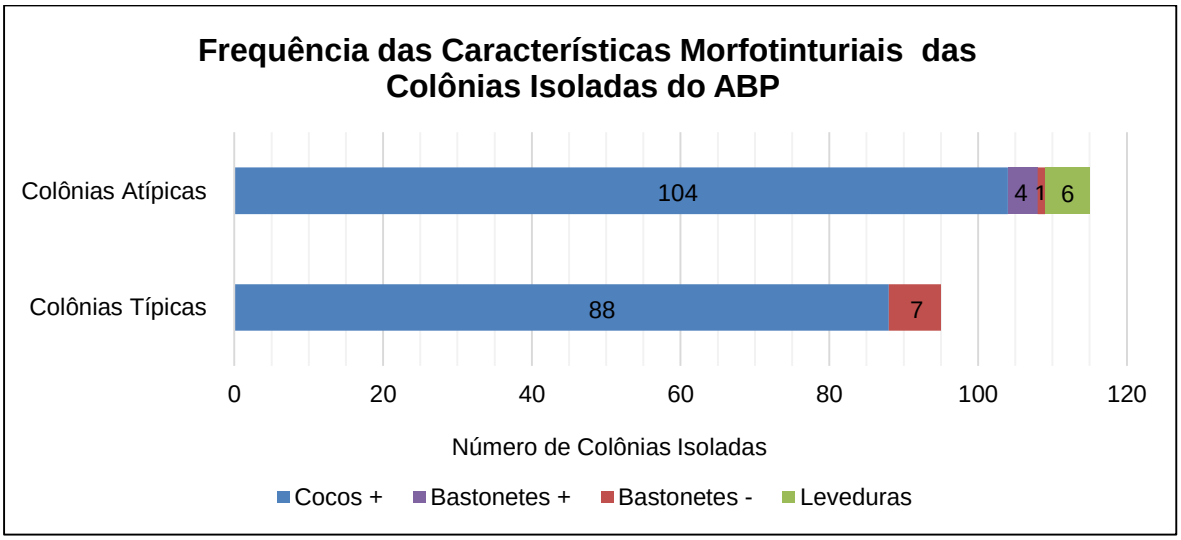

Figura 10. Frequência das características morfotintoriais das colônias isoladas do ABP.

É possível observar certa equivalência entre o PSE e o ABP relacionadas às características morfotintoriais das cepas isoladas. Tanto no PSE quanto no ABP foram

detectados bastonetes Gram-positivos, em 9,90% (11/111) e 7,37% (7/95) das colônias típicas analisadas, respectivamente, com correspondência em uma unidade amostral de *sushi* do restaurante A analisada na semana 2. Entre as colônias atípicas, foram identificadas leveduras, em 5,13% (2/39) no PSE e em 5,22% (6/115) no ABP, porém sem correspondência.

O crescimento de outros micro-organismos presentes nas amostras produzindo colônias suspeitas ou não de ECP pode ser explicado pela baixa seletividade do ABP em amostras com altos níveis da microbiota concomitante, característica já observada por diversos autores (DE BUYSER et al., 1998; NASCIMENTO; CORBIA; NASCIMENTO, 2001).

Nascimento, Corbia e Nascimento (2001) ao analisarem as limitações do ABP na enumeração de ECP em amostras de queijo Minas frescal, isolaram *S. aureus* e outros ECP, ECN, *Micrococcus* sp., *Streptococcus* sp. e leveduras de colônias típicas e atípicas e constataram que o critério de diagnóstico pelo uso da visualização de características das colônias crescidas é passível de falhas e não deve ser considerado o único indicador de ECP.

Uma vez que o PSE é um meio de cultura à base de ágar *Baird-Parker*, é possível que as deficiências do meio base tenham permanecido, mesmo após as modificações realizadas na formulação original (AFNOR, 2015).

No entanto, as análises realizadas com uso do PSE forneceram os resultados finais em 48 horas, mesmo quando foi necessário utilizar o disco *Petrifilm™ Staph Express* pelo crescimento de diferentes colônias. Além disso, a utilização do PSE e do disco complementar se mostraram bem simples e práticas. Em contrapartida, a metodologia convencional necessitou de pelo menos cinco dias de análise para obtenção dos resultados finais, visto que as placas com ABP semeadas com as diluições da amostra foram mantidas na estufa por dois dias, e em seguida, as colônias foram isoladas em TSA inclinado e semeadas em caldo BHI para, então, ser realizado o teste da coagulase e os demais testes requeridos, sem contar os dias necessários para a preparação de todo o material que acaba por ter excessivo volume (LANCETTE; BENNETT, 2001).

O limite de detecção do PSE é de < 10 UFC/g ou mL de alimento, enquanto o do ABP é < 100 UFC/g ou mL de alimento, visto que o inóculo da amostra homogeneizada e diluída no PSE é de 1 mL, e no ABP é frequentemente de 0,1 mL. Entretanto, a metodologia convencional (LANCETTE; BENNETT, 2001) consta que para alimentos em que se espera baixa contagens de ECP, a distribuição de 1 mL da diluição 10^{-1} em três placas, com inóculo de 0,4 mL, 0,3 mL e 0,3 mL. A maior quantidade de inóculo favorece o PSE na detecção de ECP.

Uma vez que foi verificado o crescimento de colônias presuntivas de ECP, conforme as instruções do fabricante (3M, 2005), em 75% (45/60) das unidades de *sushi* e *filadélfia* analisadas, nestas mesmas amostras também foram realizadas contagens de ECP. No entanto, levando-se em consideração apenas as características morfotintoriais das colônias enumeradas, já é possível constatar que somente as características morfológicas das colônias crescidas no PSE não é suficiente para inferir se a espécie é *S. aureus* ou ocasionalmente *S. hyicus* e *S. intermedius*. Há a necessidade de realizar os demais testes bioquímicos para a caracterização mais precisa das colônias típicas. Além disso, as colônias atípicas sem halo róseo pelo uso do disco *Petrifilm™ Staph Express* caracterizadas como cocos Gram-positivas, também requerem tais testes, uma vez que podem ser caracterizados como ECP, e a sua exclusão pode subestimar a presença e contagem de tais bactérias.

5.2. Correlação entre as Características das Colônias com os Testes da Coagulase, DNAse e Termonuclease

Os testes para verificação da produção das enzimas coagulase e termonuclease foram realizadas em todas as colônias isoladas do ABP, entre típicas e atípicas, previamente caracterizadas como cocos Gram-positivas e catalase positivas, e o resultado é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Características fenotípicas das colônias isoladas do ABP quanto à produção das enzimas coagulase e termonuclease.

Colônias	Resultados	Produção de Enzima		N
		Coagulase	Termonuclease	
Típicas[a]	Confirmados	4+	–	1
		4+	+	1
		1+	+	4
	Não Confirmados	1+	–	76
		–	+	6
Atípicas[b]	Confirmado	1+	–	78
		–	–	23
		–	+	1
	Não Confirmados	1+	+	2

N: número de colônias
[a] Total de colônias típicas=88
[b] Total de colônias atípicas=104

Das 192 cepas identificadas como cocos Gram-positivas, em todas foi verificada a produção da enzima catalase. Apenas 6,81% (6/88) destas cepas foram isoladas a partir de colônias típicas e caracterizadas como ECP devido à capacidade de produzir coagulase. Entretanto, em quatro cepas, das seis confirmadas como ECP, os resultados do teste da coagulase foram duvidosos, pela formação de coágulo no nível 1+, havendo a necessidade de realizar testes complementares para a caracterização, como o teste da termonuclease. Das duas cepas que produziram coágulo nítido (nível 4+), somente em uma não foi observada produção da enzima termonuclease (Tabela 2).

Dentre as demais cepas que produziram colônias típicas, 93,18% (82/88), nenhuma foi confirmada como ECP. Em 76 cepas, apesar de ter sido observado coágulos no nível 1+, não foi verificado a habilidade de produção de termonuclease. Além disso, seis cepas não produziram coagulase, entretanto, foram capazes de produzir termonuclease (Tabela 2).

Em relação aos cocos Gram-positivos que foram isolados de colônias atípicas, 98,08% (102/104) não foram caracterizados como ECP, uma vez que não produziram coagulase nem termonuclease (23): apresentaram como resultados coágulos no nível 1+ na prova da coagulase, mas não foram confirmados pelo teste da termonuclease (78) ou não tinham capacidade de produzir coagulase, mas produziram termonuclease

(1). Entretanto, duas cepas produziram ambas enzimas, e foram caracterizadas como ECP (Tabela 2).

A frequência de correlação entre as características das colônias crescidas no ABP e a capacidade de produção das enzimas coagulase e termonuclease das cepas isoladas a partir destas colônias demonstraram as falhas e deficiências do ABP na enumeração de ECP, visto que os resultados foram confirmados em 56,25% (108/192), ou seja, colônias típicas confirmadas como ECP e colônias atípicas não confirmadas como ECP. Em 43,25% (84/192) os resultados não foram confirmados, 97,62% (82/84) eram falso-positivo, pois as colônias isoladas como típicas não foram confirmadas como ECP, e 2,38% (2/84) eram falso-negativo, já que colônias atípicas foram confirmadas como ECP.

Santos (2008) demonstrou que a aleatoriedade na escolha de colônias a serem confirmadas, assim como a variabilidade entre as características próprias de cada tipo de colônia podem levar a resultados imprecisos. Em seu estudo, o autor também obteve resultados divergentes ao esperado em 37,41% (58/155) das cepas isoladas, com a ocorrência de falso-negativos e falso-positivos em 24,14% (14/58) e 75,86% (44/58), respectivamente.

Lancette e Bennett, (2001) afirmaram que os resultados falso-negativos podem ser ocasionados por condições adversas em que ECP são submetidos nos alimentos, o que pode alterar as características deste micro-organismo ao se desenvolverem no meio de cultura.

A metodologia convencional de enumeração de ECP (LANCETTE; BENNETT, 2001), tomando como referência *S. aureus*, se mostra controversa e imprecisa, uma vez que nem todos os ECP compartilham entre si e com a espécie *S. aureus* as mesmas características quanto à produção das enzimas coagulase e termonuclease. E, ainda, a correlação feita entre a produção dessas enzimas com o potencial enterotoxigênico também é inexata, pois algumas espécies desse grupo, não são capazes de produzir SE.

As espécies de ECP já descritas na literatura como produtoras de enterotoxinas, assim como a capacidade ou não de produção das enzimas coagulase e termonuclease, são apresentadas no Quadro 3.

Espécies	Teste da Coagulase	Teste da Termonuclease	Referência
Staphylococcus aureus	+	+	Robbins et al. (1974)
Staphylococcus delphini	+	-	Sledge et al. (2010)
Staphylococcus hyicus	D	+	Fukuda et al. (1984)
Staphylococcus intermedius	+	+	Adesiyun; Tatini; Hoover (1984)
Staphylococcus pseudintermedius	+	ND	Tanabe et al. (2013)

Quadro 3. Espécies de estafilococos coagulase positiva produtores de enterotoxinas e suas caracteristicas fenotípicas quanto à produção das enzimas coagulase e termonuclease.
+: 90% ou mais cepas são positivas
-: 90% ou mais cepas são negativas
d: 11-89% das cepas são positivas
ND: não definido.

A espécie *S. hyicus* se caracteriza por produção variável da enzima coagulase, sendo frequentemente considerada muito fraca ou negativa (HERMANS et al., 2008), podendo ser excluída durante a análise de alimentos. No presente estudo, sete cepas não foram caracterizadas como ECP, e, portanto, não foram consideradas na contagem, uma vez que não produziram coagulase, apesar ter sido verificado a produção de termonuclease, característica de *S. hyicus.*

Em relação ao PSE, apesar das instruções recomendar a realização dos testes bioquímicos na identificação de ECP, já foi discutido anteriormente a importância de se verificar a capacidade das cepas isoladas de produzir coagulase e termonuclease, mesmo o método alternativo (3M, 2005) determinando investigar apenas a produção de DNAse pelo uso do disco *Petrifilm™ Staph Express*.

O teste da DNAse já foi utilizado como ferramenta diagnóstica para a identificação de cepas de *S. aureus* e previsão de sua patogenicidade. Porém, a verificação da atividade desta enzima não reflete resultados fidedignos quando comparado como o teste da coagulase (KONEMAN et al., 1993). Atualmente o teste da DNAse não é recomendado pela metodologia convencional na identificação de ECP, apenas o teste da termonuclease (LANCETTE; BENNETT, 2001).

A fim de avaliar o PSE na exatidão de seus resultados, foram selecionadas todas as cepas isoladas de colônias típicas e atípicas referentes uma semana (semana 5) para observação da capacidade de produção das enzimas coagulase, termonuclease, e, também, DNAse (Tabela 3).

Tabela 3. Características fenotípicas das colônias isoladas do PSE referentes a semana 5 quanto à produção das enzimas coagulase, DNAse e termonuclease.

Colônias	Resultados	Produção de Enzima			N
		Coagulase	DNAse*	Termonuclease	
Típicas[a]	Confirmados	4+	–	–	2
		4+	+	+	1
		1+	+	+	2
	Não Confirmados	1+	–	–	20
		–	–	–	4
Atípicas[b]	Confirmado	1+	–	–	4
	Não Confirmados	1+	–	+	1

*Teste realizado de acordo com Lancette e Bennett, (2001)
N: número de colônias
[a] Total de colônias típicas=29
[b] Total de colônias atípicas=5

Todas as 34 cepas selecionadas foram caracterizadas como cocos Gram-positivas e catalase positivas. Das 34 cepas isoladas, 85,29% (29/34) eram colônias típicas e 14,71% (5/34) eram colônias atípicas (Tabela 3).

Apenas 17,24% (5/29) das cepas isoladas de colônias típicas foram confirmadas como ECP. Destas, duas (2/5) cepas produziram coágulo nítido e não foi observado produção de DNAse e termonuclease, uma (1/5) cepa também teve formação de coágulo nítido no teste da coagulase e produziu DNAse e termonuclease, e duas (2/5) cepas tiveram o resultado do teste da coagulase duvidoso, pela formação de coágulo no nível 1+, mas foram identificadas como ECP porque produziram termonuclease e DNAse. Apesar da produção de coagulase não ter sido totalmente relacionada com a presença das enzimas DNAse e termonuclease, a produção destas duas nucleases estavam associadas. Dentre as demais cepas que se apresentaram como colônias típicas, 82,36% (24/29) foram resultados falso-positivos (Tabela 3).

Em relação às cepas isoladas a partir de colônias atípicas, quatro (4/5) não foram caracterizadas como ECP, uma vez que apresentaram coágulos no nível 1+ na prova da coagulase, mas não foram confirmados pelo teste da termonuclease e não produziram DNAse. Uma (1/5) cepa foi identificada como resultado falso-negativo, pois produziu coagulase e termonuclease e foi caracterizada como ECP. Esta cepa foi excluída na contagem de ECP, pelo fato de ter sido isolada a partir de colônias atípicas e não produzir DNAse.

Vários estafilococos possuem a habilidade de produzir DNAse, embora nem todos sejam produtores de termonuclease, coagulase e enterotoxinas. Um resumo dos *Staphylococcus* spp. enterotoxigênicos descritos na literatura produtores das enzimas DNAse, coagulase e/ou termonuclease, é mostrado no Quadro 4.

Espécies	Teste da Coagulase	Teste da DNAse	Teste da Termonuclease	Referência
Staphylococcus aureus	+	+	+	Robbins et al. (1974)
Staphylococcus caprae	-	+	-	Valle et al. (1990); Mariano et al. (2007)
Staphylococcus capitis	-	W	-	Vernozy-Rozand et al. (1996)
Staphylococcus chromogenes	-	W	-w	Valle et al. (1990); Mariano et al. (2007)
Staphylococcus cohnii	-	-w	-	Mariano et al. (2007)
Staphylococcus delphini	+	W	-	Sledge et al. (2010)
Staphylococcus epidermidis	-	-w	-w	Bergdoll (1986); Valle et al. (1990)
Staphylococcus haemolyticus	-	d	-	Valle et al. (1990); Mariano et al. (2007)
Staphylococcus hominis	-	-w	-	Udo et al. (1999)
Staphylococcus hyicus	d	+	d	Fukuda et al. (1984)
Staphylococcus intermedius	+	+	+	Adesiyun; Tatini; Hoover (1984)
Staphylococcus lentus	-	+w	ND	Valle et al. (1990)
Staphylococcus lugdunensis	-	ND	-	Mariano et al. (2007)
Staphylococcus pseudintermedius	+	+	ND	Tanabe et al. (2013)
Staphylococcus sciuri	-	+w	-	Valle et al. (1990)
Staphylococcus simulans	-	W	-w	Vernozy-Rozand et al. (1996)
Staphylococcus warnei	-	d	-	Valle et al. (1990); Mariano et al. (2007)
Staphylococcus xylosus	-	-w	-	Valle et al. (1990); Mariano et al. (2007)

Quadro 4. Espécies de estafilococos produtores de enterotoxinas e suas caracteristicas fenotípicas quanto à produção das enzimas coagulase, DNAse e termonuclease.
+: 90% ou mais cepas são positivas
-: 90% ou mais cepas são negativas
d: 11-89% das cepas são positivas
w: reação fraca
-w: reação fraca a negativa
+w: reação positiva a fraca
ND: não definido

Assim como o ABP, o PSE também possui diversas imprecisões. A determinação do teste da DNAse pelo uso do disco *Petrifilm™ Staph Express* é bastante confusa, uma vez que o método é voltado para detecção de ECP, e principalmente *S. aureus*, apenas o teste da produção da enzima DNAse permite com que muitos ECN sejam caracterizados erroneamente como ECP, levando a resultados inexatos.

Portanto, a caracterização julgando apenas as características morfológicas das colônias e a produção de DNAse é uma limitação do PSE, e deve ser revista pelo fabricante. Esta opinião é compartilhada por Silva et al. (2005), que confirmaram a presença de *S. aureus* em apenas 22,85% (8/35) placas de PSE que continham somente colônias suspeitas deste micro-organismo isoladas de leite.

Uma vez que ambos os métodos são imprecisos e possuem limitações na identificação de ECP, foi realizada uma avaliação da correlação entre as diferentes características morfológicas das colônias e características fenotípicas das cepas isoladas do PSE e do ABP quanto à produção das enzimas coagulase e termonuclease, que é apresentada na Tabela 4. Para tal análise, foram selecionadas todas as cepas isoladas de colônias típicas e atípicas referentes uma semana (semana 5).

Tabela 4. Correlação entre as colônias típicas e atípicas isoladas do PSE e ABP e as características fenotípicas das colônias isoladas quanto à produção das enzimas coagulase e termonuclease.

Colônias	Método	Resultado		N	Análise Estatística
		Confirmado	Não Confirmado		
Típicas	PSE	5	24	29	$\chi^2 = 0,1$
	ABP	3	19	22	$p > 0,05$
Atípicas	PSE	4	1	5	$\chi^2 = 7,4$
	ABP	36	0	36	$p < 0,05$

Na análise estatística dos dados foi demonstrado que a proporção de colônias típicas confirmadas pelos testes bioquímicos foi independente do método utilizado, sem diferença significativa ($p > 0,05$). A baixa frequência das colônias típicas confirmadas pelos testes da coagulase e/ou termonuclease foi observada em ambos

métodos, 17, 24% (5/29) no PSE e 13,64% (3/22) no ABP, e consequentemente, a frequência dos resultados falso-positivos também são equivalentes no PSE e ABP, de 82, 76% (24/29) e 86,36% (19/22), respectivamente (Tabela 4).

Em relação as colônias atípicas, a proporção de colônias confirmadas pelos testes bioquímicos não foi independente do método, e houve diferença significativa ($p < 0,05$). Nenhuma colônia atípica isolada do ABP foi caracterizada como ECP, enquanto apenas uma colônia atípica do PSE foi identificada como ECP (falso-negativo), fazendo a medida da variância ser muito grande (Tabela 4).

Diferentemente deste trabalho, Viçosa et al. (2010) verificaram boa correlação entre colônias típicas e habilidade de produção de coagulase e termonuclease pelo PSE, e consideraram o método com boas estimativas para ECP.

A recuperação de ECP a partir de colônias típicas e atípicas foi maior no PSE 17,65% (6/34), do que no ABP 5,17% (3/58) (Tabela 4). Além disso, o ABP favoreceu o maior desenvolvimento de cocos Gram-positivos coagulase negativo, caracterizados como ECN em 81,03% (47/58) e outros cocos Gram-positivos em 13,80% (8/58), conforme ilustrado na Figura 11.

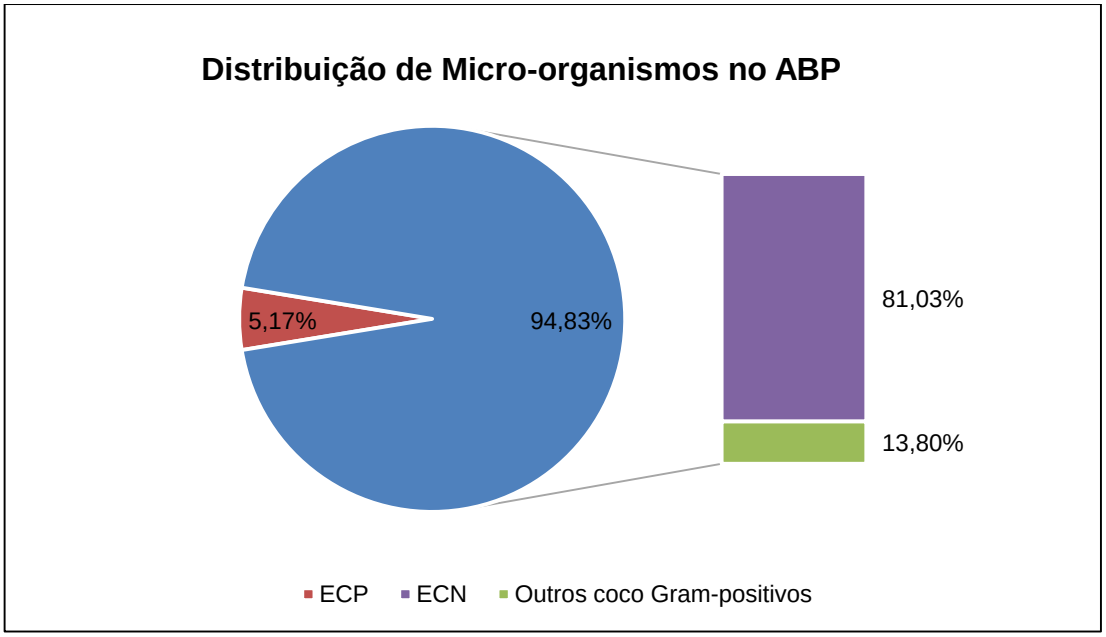

Figura 11. Distribuição dos micro-organismos no ABP referente à semana 5.

No PSE foi observado presença de ECN em 44,12% (15/34) e outros cocos Gram-positivos em 38,23% (13/34), de acordo com a Figura 12.

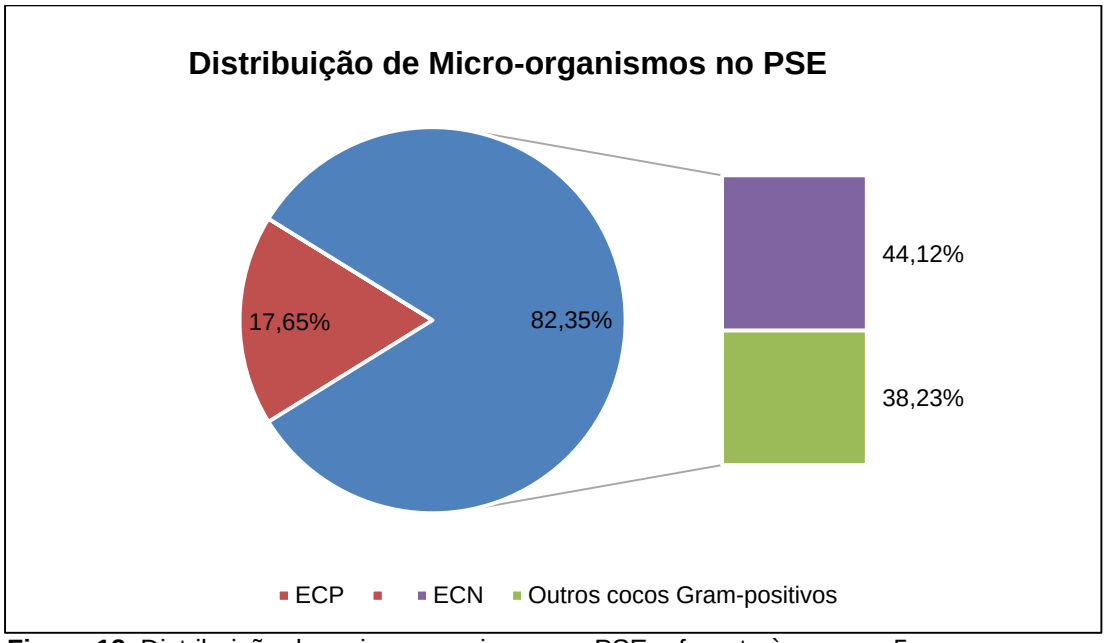

Figura 12. Distribuição dos micro-organismos no PSE referente à semana 5.

Souza (2013) também observou maior frequência de ECP no PSE do que no ABP, concluindo que o PSE é mais sensível na detecção de ECP quando comparado com a metodologia convencional, ao avaliar a aplicabilidade do PSE na enumeração de *S. aureus* no leite de origem ovina.

Após a identificação precisa de ECP pelos testes adicionais das cepas isoladas do PSE, julgou-se necessário realizar uma nova comparação entre as médias das contagens do PSE e ABP referente à semana 5, tendo sido feita as correções adequadas, de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5. Média e desvio padrão das contagens de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva confirmados pelos testes bioquímicos adicionais no *Petrifilm™ Staph Express* e ágar *Baird-Parker* das amostras de *sushi* e *filadélfia* dos restaurantes A e B na semana 5 e seus valores-p de comparação.

Semana	**Média das Contagens (UFC/g) ± Desvio Padrão**		**Valor-p**
	Petrifilm™ Staph Express	**Ágar *Baird-Parker***	
5	$1,78 \times 10^{2} \pm 2,63 \times 10^{2}$	$4,50 \times 10^{1} \pm 1,43 \times 10^{2}$	0,179*

* Não apresenta diferença significativa.

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre as contagens médias de ECP obtidas pelas metodologias avaliadas, independentemente do tipo de amostra (*sushi* e *filadélfia*) (Tabela 5). Resultados similares já foram relatados por Ingham, Becker e Fanslau (2003), Gombossy et al. (2005), Fedio et al. (2008) Viçosa et al. (2010), Zhang et al. (2012).

Apesar da equivalência estatística na enumeração de ECP entre os métodos após a identificação das colônias isoladas e na baixa correlação entre as frequências das colônias presuntivas com resultado confirmados foram observadas algumas vantagens do PSE em relação à metodologia convencional, ABP, como a maior recuperação de ECP, menor ocorrência de ECN e outros cocos Gram-positivos coagulase negativa produzindo colônias suspeitas, menor limite de detecção, maior concentração do inóculo da amostra, facilidade e praticidade no uso da técnica e menor tempo de análise para a obtenção dos resultados finais.

Tais características tornam o PSE uma alternativa interessante à metodologia convencional, apesar de imprecisões como apenas recomendação da detecção de DNAse pelo uso do disco *Petrifilm™ Staph Express* na identificação de *S. aureus* e outros ECP, devem ser revistas pelo fabricante, sendo uma limitação do método. E ainda, uma vez que o método é direcionado para produtos alimentícios e confirma a possibilidade dos resultados positivos não serem apenas *S. aureus*, a substituição no nome e na descrição do método de "*S. aureus"* para "*Staphylococcus* spp. coagulase positiva" é mais adequada e se faz necessária.

Sendo assim, a utilização do PSE juntamente com a seleção de colônias por amostragem para caracterização fenotípica da habilidade de produção das enzimas coagulase e termonuclease, apesar de certas inconveniências, ainda são considerados como os melhores testes para inferir sobre a capacidade enterotoxigênica das espécies apenas pelas características bioquímicas, sendo uma boa opção para reduzir o tempo de análise e gerar resultados mais confiáveis.

5.3. Avaliação da Qualidade Microbiológica do *Sushi* e *Filadélfia* pela Pesquisa de *Staphylococcus* spp. Coagulase Positiva

A ocorrência de ECP foi observada em apenas 8,33% (5) das 60 unidades amostrais de preparações à base de pescado cru da culinária japonesa analisadas nos dois restaurantes: uma unidade de *sushi* do restaurante A, e três unidades de *sushi* e uma unidade de *filadélfia* do restaurante B, com baixas contagens de $5{,}0x10^1$ a $6{,}9x10^3$ UFC/g, de acordo com a metodologia preconizada pela legislação nacional (BRASIL, 2001).

A legislação brasileira estabelece que pratos prontos para o consumo à base de carnes, pescados e similares cru, como o *sushi* e suas variações, devem conter até $5x10^3$ UFC/g de alimento de ECP para uma amostra indicativa (BRASIL, 2001). Apenas na unidade amostral de *filadélfia* do restaurante B (1/60), a contagem de ECP de $6{,}9x10^3$ UFC/g, estava acima do limite permitindo pela legislação.

A baixa frequência de amostras com contagens de ECP em desacordo com a legislação vigente em pratos da culinária oriental à base de pescado cru foi relatada também por outros autores, em diferentes regiões do Brasil (MARTINS, 2006; VIEIRA et al., 2007; SANTOS et al., 2012; CARMO et al., 2013). Vieira et al. (2007) detectaram ECP acima do permitido pela legislação em 28,1% (9) das 32 amostras de *sushi* preparados com diferentes frutos do mar e adquiridas em restaurantes da cidade de Fortaleza, Ceará. Contudo, Santos et al. (2012) verificaram a presença de *S. aureus* em 45,7% (16) das 35 amostras de *sushi* de salmão analisadas, onde 25% (4/16) possuíam níveis em desacordo com os padrões estabelecidos pela legislação vigente, em restaurantes de Aracaju, Sergipe. E Carmo et al. (2013) constataram a presença de ECP em 37,5% (6) das 16 amostras de *sushi* preparados a partir de salmão, atum e peixe branco, das quais 12,5% (2/16) estavam acima do limite determinado pela ANVISA, de restaurantes *self-service* de diferentes regiões do município do Rio de Janeiro.

Os resultados encontrados neste estudo são indicativos de que em ambos os restaurantes (A e B) a qualidade microbiológica das preparações à base de pescado cru analisadas (*sushi e filadélfia*) quanto a pesquisa de ECP, estavam adequadas para o consumo, indicando boas práticas de manipulação durante a preparação desses

alimentos e condições higiênico-sanitárias satisfatórias do ambiente de processamento.

No entanto, é muito importante ressaltar que a ausência de células viáveis de ECP no momento da análise do produto final não assegura que o alimento esteja livre de SEs (LANCETTE; TATINI, 1992), uma vez que tanto o *sushi* quanto o *filadélfia* são preparações que levam arroz, o qual sofreu cocção para a montagem do produto final, e tal tratamento térmico pode ter eliminado apenas a bactéria. Além disso, uma vez que as amostras foram analisadas logo após a preparação, o tempo de espera até consumo, assim como a temperatura de exposição que podem levar a multiplicação dos ECP presentes nos alimentos, não foram fatores existentes durante as análises.

Apenas a detecção de enterotoxinas no produto final poderia atestar a inocuidade definitivamente, entretanto a pesquisa de enterotoxinas diretamente nos alimentos é pouco utilizada na rotina laboratorial devido ao seu alto custo, e não é determinada pela legislação vigente (BRASIL, 2001).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir da realização deste trabalho permitiram chegar às seguintes conclusões:

- As contagens de ECP nas amostras pelo PSE foram superestimadas quando realizadas apenas pela observação das características das colônias, conforme as instruções do fabricante, e diferiram estatisticamente das contagens obtidas pelo uso da metodologia convencional.

- O isolamento das colônias típicas e atípicas crescidas no PSE com posterior realização pelos testes da coagulase e termonuclease, permitiram realizar contagens de ECP mais precisas, as quais não apresentaram diferenças significativas das contagens obtidas pelo ABP.

- O disco *Petrifilm™ Staph Express* representa a principal limitação do PSE, pois a verificação da habilidade de produção da DNAse não é capaz de inferir a espécie nem caracterizar como ECP, podendo levar à contagem indevida de várias outras espécies de estafilococos não produtoras de coagulase.

- O PSE se mostrou similar ao ABP na dificuldade da visualização de colônias suspeitas de ECP, na baixa correlação de as colônias presuntivas com resultado confirmado e na elevada frequência de resultados falso-positivos.

- As principais vantagens do PSE observadas foram a maior capacidade de detecção de ECP, menor frequência de ECN e outros cocos Gram-positivos coagulase negativos, menor limite de detecção do método, maior quantidade de inóculo em uma placa, facilidade e praticidade no uso e menor tempo de análise.

- A utilização do PSE com seleção de colônias por amostragem para realização dos testes da coagulase e termonuclease, que se apesar de certas inconveniências, se mostrou uma alternativa interessante a metodologia convencional na enumeração de ECP.

- As amostras de *sushi* e *filadélfia* de ambos os restaurantes estavam satisfatórias para o consumo, no parâmetro ECP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3M 2015. Disponível em: <http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt_BR/Microbiology/FoodSafety/product-information/product-catalogr/?PC_Z7_RJH9U5230GD8A0I8TS8AOO2C43000000_nid=D7BKZ3NP1MbeRNSP8PD320gl>. Acesso em: 28 jan. 2015.

3M. Petrifilm Guia de Interpretação. **Placa Petrifilm™ Staph Express para contagem expressa de *Staphylococcus aureus*.** 2005. São Paulo: 3M Microbiologia.

ADESIYUN, A. A.; TATINI, S. R.; HOOVER, D. G. Production of enterotoxin(s) by *Staphylococcus hyicus.***Vet Microbiol.**, v. 9, n. 5, p. 487-495, 1984.

AFNOR CERTIFICATION VALIDATION OF THE METHOD. **Petrifilm Staph Express (STX) for the enumeration of coagulase positive *Staphylococcus*. Protocol for all food products and pet food. Comparison with the method described in the standard EN ISO 6888-1/A1.** 2015. Disponível em: < http://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2014/03/Synt-3M-01-09-04-03-A_en.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2015.

AHMADI, M., ROHANI, S.M.R., AYREMLOU, N. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by PCR. **Comp Clin Pathol**, v. 19, n. 1, p. 91-94, 2010.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 2001. Whashington: DCC Vanderzant & DF Splittstoesser.

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, 2010.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). *Staphylococcus aureus* in foods: surface plating method for isolation and enumeration. In: CUNNIFF, P.A. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Gaithersburg: AOAC International, 1995. p. 33-34.

ATANASSOVA, V.; REICH, F.; KLEIN, G. Microbiological quality of sushi from sushi bars and retailers. **J Food Prot.**, v. 71, n. 4, p. 860-4, 2008.

BAIRD-PARKER, A.C. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. **J Appl Bacteriol**, v. 25, n. 1, p. 12 – 19, 1962.

BAIRD-PARKER, A.C. The staphylococci:an introduction. **J Appl Bacteriol Symp Supp,** v. 69, n. 19, p. 1S – 8S, 1990.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. **Int J Food Microbiol**, v. 61, n. 1, p. 1 – 10, 2000.

BECKER, K.; VON EIFF, C. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. In: VERSALOVIC, K. et al. **Manual of Clinical Microbiology.** Washington: ASM Press, 2011. p. 308-338.

BELAY, N.; RASOOLY, A. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in an anaerobic environment. **J Food Prot,** v. 65, n. 1, p. 199-204, 2002.

BENNETT, S. D.; WALSH, K. A.; GOULD, L. H.“Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus, Clostridium perfringens,* and *Staphylococcus aureus*—United States, 1998–2008” **Clin Infect Dis.,** v. 57, p. 425-433, 2013.

BENNETT, R. W.; MONDAY, S. R. *Staphylococcus aureus*. In: MILLIOTIS, M. D.; BIER, J., W. **International Handbook of Foodborne Pathogens.** New York: Marcel Dekker, Inc., 2003, cap. 4, p. 41-59.

BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **Int J Food Microbiol**, v.10, p.91-100, 1990.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus.* In: DOYLE, M. P. **Foodborne bacterial pathogens.** New York: Marcel Dekker Inc., 1989, p. 463-523.

BERGDOLL, M.S.; WONG, A.C.L. Staphylococccal intoxications. In: CLIVER, D., POTTER, M., RIEMANN, H.P. **Foodborne Infections and Intoxications**, Academic Press. 2006, p. 523-556.

BIOMÉRIEUX 2015. *Staphylococcus* conventional media. Disponível em: <http://www.biomerieux-industry.com/food/staphylococcus-conventional-media>. Acesso em: 20 jun. 2015.

BOOTHBY, J.; GENIGEORGIS C.; FANELLI, M. J. Tandem coagulase/termonuclease agar method for thedetection of *Staphylococcus aureus.* **Appl Environ Microbiol**., v. 37, n. 2, p. 298–302, 1979.

BORGES, M.F. **Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo de coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência.** 2006. 199 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

BRASIL. RESOLUÇÃO RDC no. 12, de 2 de janeiro de 2001, dispõe sobre o **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01.rdc.ht m>. Acessado em: 6 mai. 2014.

BRECKINRIDGE, J. C.; BERGDOLL, M. S. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin-producing *Staphylococcus.* **N Engl J Med**, v. 284, n. 10, p. 541-543, 1971.

BYRD-BREDBENNER, C.; BERNING, J.; MARTIN-BIGGERS, J.; QUICK, V. “Food safety in home kitchens: a synthesis of the literature”. **Int J Environ Res Public Health**, v. 10, p. 4060–4085, 2013.

CARMO, J. M.; CABRAL, C.C; LOPES, C. S. C.; LEONARDO, R.; CARVALHO, A. C. S.; DEL AGUILA, E. M.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F. Análise da qualidade microbiológica de sushi e sashimi comercializados em restaurantes *self-service* na cidade do Rio de Janeiro: enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva e detecção de *Listeria monocytogenes*. In: **27º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2013.

CARMO, L. S.; CUMMINGS, C.; LINARDI, V.R.; DIAS, R. S.; DE SOUZA, J. M.; DE SENA, M. J.; DOS SANTOS, D.A; SHUPP, J.W; PEREIRA, R. K.; JETT, M. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. **Foodborne Pathog Dis.**, v. 1, n. 4, p. 241-246, 2004.

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, n. 1, p. 9-14, 2002.

CARDOSO, N. L. C; ANDRÉ, M. C. D. P. B; SERAFINI, A. B. Avaliação microbiológica de carne de peixe comercializada em supermercados da cidade de Goiânia – GO. **Rev Hig Alim**, v. 17, n. 109, p. 81 - 87, 2003.

COMUNIDADE EUROPÉIA (CE). REGULAMENTO (CE) nº. 2073/2005 DA COMISSÃO de 15 de Novembro de 2005 relativo a **Critérios Microbiológicos Aplicáveis aos Géneros Alimentícios.** Disponível em:< http://www.esac.pt/noronha/legislalimentar/regulamento_1441_2007_criterios_ micro.pdf>. Acesso: 07 jun. 2015.

DABROWSKI, W.M.; SIKORSKI, Z. E**. Toxins in Food** (Chemical and functional properties of food series). CRC Press, 355p, 2005.

DACK, G. M. Staphylococcus Food Poisoning. In: DACK, G. M. **Food Poisoning**. Chicago: The University of Chicago Press, 1943.

DE BUYSER, M.L.; AUDINET, N.; DELBART, O. MAIRE, M. FRANÇOISE, F. Comparison of selective culture media to enumerate coagulase-positive staphylococci in cheeses made from raw milk. **Food Microbiol.**, v. 1, n. 15, p. 339-346, 1998.

DESMARCHELIER, P.M.; HIGGS, G.M.; MILLS, L.; SULLIVAN, A.M.; VANDERLINDE, P.B. Incidence of coagulase positive Staphylococcus on beef carcasses in three Australian abattoirs. **Int. J. Food Microbiol**. v. 47, p. 221-229, 1999.

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** Washington: APHA, 2001. p. 69-403.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA); EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013,** 2015. Disponível em < http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/EU-summary-report-trends-sources-zoonoses-2013.pdf>.Acesso em: 04 jun. 2015.

EUZÉBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. Disponível em: <http://www.bacterio. cict.fr/s/staphylococcus.html>. Acesso em: 05 jun. 2015.

EVENSON, M.L.; HINDS M. W.; BERNSTEIN R.S.; BERGDOLL M. S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **Int J Food Microbiol**, v. 7, p. 311-316, 1988.

FEDIO, W. M.; WENDAKOON, C. N.; ZAPATA, R.; CARRILLO, C.; BROWNING, P. Comparison pf Petrifilm™ Staph Express Cpunt System with the *Bacteriological Analytical Manual* direct-plating method for enumeration of *Staphylococcus aureus* in artificially contaminated hard cheese. **J AOAC Int.**, v. 91, n. 5, 2008.

FRANCO, B. D. G. M.; BELOTTI, V. Repetibilidade e reprodutibilidade: importantes vantagens das placas PetrifilmTM de contagem de micro-organismos em alimentos. **J AOAC.,** v. 2, n. 83, p. 242-248, 1990.

FRANCO, B.D.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: FRANCO, B.D. et al. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 43-46.

FUKUDA, S.; TOKUNA, H.; OGAWA, O.; SASAKI, M.; KISHIMOTO, T.; KAWANO, J.; SHIMIZU, A.; KIMURA, S. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* strains isolated from dogs. **Zbl Bakteriol Hyg.**, v. 258, p. 360-367, 1984.

FUNG, D. Y. C. Rapid methods and automation in Microbiology. Comprehensive reviews in food science and food safety. **Inst Food Tec**, v. 1, p. 2-22, 2002.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the manual. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 119-166.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Qualidade do pescado. In: GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** São Paulo: Manole, 2014. p. 167-177.

GOMBOSSY, B.D.; NODA, P.K.; FRANCO, G.M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.; TASSINARI A. R. **Express evaluation – An evaluation of 3M Petrifilm Staph Express count system for enumerating coagulase-positive *Staphylococcus*.** Food Quality, 2005. Disponível em: <http://www. foodquality.com/mag/12012005/fq_12012005_IL1.htm>. Acessado em: 03 jan. 2015

GÖTZ, F., BANNERMAN, T.; SCHLEIFER, K.H. The genera *Staphylococcus* and *Macrococcus*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria**. New York: Springer, 2006. p. 5-75.

HAIT, J. B.S. *Staphylococcus aureus.* In: LAMPEL, K. A., AL-KHALDI, S., CAHILL, M. S. **Bad Bug Book - Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins**. USA: FDA, 2012. p. 86-91.

HALPIN-DOHNALEK, M.I.; MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus*: Production of extracellular compounds and behavior in foods - a review. **J Food Prot,** v. 52, p. 267-282, 1989.

HAYNES, W. M. C.; HUCKER, G. J. A review of *Micrococcus* enterotoxin food poisoning. **Food Res.**, v. 11, n. 4, p. 281-297, 1946.

HENNEKINNE, J.-A., DE BUYSER, M.-L., DRAGACCI, S. 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiol Rev**., v. 36, p. 815-836, 2012.

HENNEKINNE, J. A.; OSTYN, A.; GUILLIER, F.; HERBIN, S.; PRUFER, A. L.; DRAGACCI, S. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? **Toxins**, v. 2, p. 2106-2116, 2010.

HERMANS, K.; DEVRIESE, L.A.; HAESEBROUCK, F. *Staphylococcus*. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals.** Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2008. p 43-57.

HOLT, J. G. et al. Groups within the four major categories of bacteria. In: HOLT, J. G. et al. **Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 527-558.

INGHAM, S. C.; BECKER, K. T.; FANSLAU, M. A. Comparison of the Baird-Parker agar and 3M Petrifilm Staph Express count plate methods for enumeration of *Staphylococcus aureus* in naturally and artificially contamined foods. **J Food Prot**., v. 66, n. 11, p. 2151-2155, 2003.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Ecologia microbiana de los alimentos: factores que afetam a la sobrevivencia de los microrganismos en los alimentos**. 1983. Zaragoza: Acribia, v.1, p. 231-250.

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

JABLONSKI, L.M.; BOHANCH, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P. et al. **Food microbiology: fundamentals and frontiers.** Washington: ASM Press, 2001. p. 411-434.

JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P.; RAJKOVIC, A.; UYTTENDAELE, M. Alternative microbial methods: an overview and selection criteria. **Food Microbiol**, v. 27, n. 6, p. 710-730, 2010.

JAY, J. M. Gastrenterite estafilocócica. In: JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos.** Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 471-485.

KADARIYA, J.; SMITH, T. C.; THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. **Biomed Res Int.**, 2014.

KIM, N. H.; YUN, A. R.; RHEE, M. S. Prevalence and classification of toxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from refrigerated ready-to-eat foods (sushi, kimbab and California rolls) in Korea. **J Appl Microbiol.,** v. 111, p. 1456–1464, 2011.

KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Genus IV. *Staphylococcus*. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p. 1013–1035.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL JR, V.R. **Diagnóstico microbiológico. Texto e atlas colorido**, 2. ed. São Paulo: Panamericana, 1993, p. 280 – 281.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** Washington: APHA, 2001. p. 387-403.

LANCETTE, G. A.; TANINI, S. R. *Staphylococcus* aureus. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** Washington: APHA Press, 1992. p. 533-550.

LANTZ, P.; HAHN-HÄGERDAL, B.; RADSTRÖM, P. Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. **Trend Food Sci Tech.**, v. 5, n.1, p. 384-389, 1994.

LE LOIR, Y., BARON, F., GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning**. Genet Mol Res.,** v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LUDWIG, W; SCHLEIFER K.; WHITMAN, W.B. Revised road map to the phylum firmicutes. **Bergey's Outiline**, v.3, p. 1-8, 2008. Disponível em: < http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_3_Outline .pdf>. Acesso em: 30 mar. 2015.

MARIANO, F. A.; FOLLY, M. M.; TEIXEIRA, G. N.; CARMO, L. S.; VIEIRA-DAMOTTA, O. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de leite de cabras do estado do Rio de Janeiro. **Rev Brasil de Ciênc Vet.**, v. 14, n. 2, p. 105-110, 2007.

MARTINS, F. O. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (sushi e sashimi) a base de pescado cru servidos em bufês na cidade de São Paulo.** 2006. 121 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

MATTHEWS, K.R.; ROBERSON, J.; GILLESPIE, B.E.; LUTHER, D.A.; OLIVER, S.P. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **J Food Prot,** v. 60, n. 6, p. 686-688, 1997.

MCMAHON, W. A.; ALEO, V. A.; SCHULTZ, A. M.; HORTER B. L.; LINDBERG K. G. 3M™ *Petrifilm™ Staph Express* count plate method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected types of meat, seafood, and poultry: collaborative study. **J AOAC Int.**, v. 86, n. 5, 2003.

MENZIES, R.E. Comparison of coagulase, deoxyribonuclease (DNase), and heatstable nuclease tests for identification of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Pathol,** v. 30, n. 7, p. 606-608, 1977.

MIDURA, T. F.; BRYANT, R. G. Sampling plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** Washington: APHA, 2001. p. 87-403.

MIRANDA, A. C.; BAIÃO, R. C. Avaliação das boas práticas na fabricação de preparações à base de pescados crus em restaurante. **C&D-Rev Eletrônica da Fainor.**, v. 4, n. 1, p. 52-61, 2011.

MONTVILLE, T.J.; MATTHEWS, K.R. *Staphylococcus aureus*. In: MONTVILLE, T.J. et al. **Food microbiology: an introduction.** Washington: ASM Press, 2008. p. 189-200.

MONTGOMERY, D. C., RUNGER, G. C. **Applied Statistics and Probability for Engineers**. New York: John Wiley & Sons, 2002.

NASCIMENTO, M. G.; CORBIA, A. C.; NASCIMENTO, E. R. Limitações da técnica de isolamento e enumeração de *Staphylococcus aureus*. **Comunicado Técnico**, v. 45, p.1-4, 2001

NERO , L.A.; BELOTI , V.; BARROS, M.A.F. Métodos rápidos e automatizados para enumeração de micro-organismos indicadores em leite - utilização no Brasil. **Semina: Ciênci Agra**r, v. 21, n. 1, p. 115-126, 2000.

OGSTON, A.; WITTE, W. On Abscesses. **Rev Infect Dis**, v. 6, p. 122-128, 1984. Disponível em: <http://www.jstor.org/discover/10.2307/4453267?uid=3737664&uid=2&uid=4&sid=21103386361897>. Acesso em: 10 fev. 2014.

OLIVEIRA, A. M.; MIYA, N. T. N.; SANT´ANA, A. S.; PEREIRA, J. L. Behavior and enterotoxin production by coagulase negative Staphylococcus in cooked ham, reconstituted skimmed milk and confectionary cream. **J Food Sci.**, v. 75, n. 7, p. 475-481, 2010.

OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; SHIMODA, Y.; HU, D-L.; UEDA, S. Detection of *seg, seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg, seh*, or *sei* genes. **J Clin Microbiol.**, v. 40, n. 3, p. 857–862, 2002.

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

ONO, H.K.; OMOE, K.; IMANISHI, K.; IWAKABE, Y.; HU, D.L.; KATO, H.; SAITO, N.; NAKANE, A.; UCHIYAMA, T.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. **Infect Immun.** v. 76, n. 1, p. 4999-5005, 2008.

PEREIRA, K. S. **Identificação e verificação do potencial enterotoxigênico de Staphylococcus spp. coagulase negativa isolados a partir de salames brasileiros industrializados e avaliação da qualidade microbiológica do produto.** 2006. 99 f. Tese (Doutorado em Ciência de alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

PIMBLEY, D.W.; PATEL, P.D. A review of analytical methods for the detection of bacterial toxins. **J Appl Microbiol Symp Supp**, v. 84, n. 1, p. 98-109, 1998.

PINHEIRO, H.M.C.; VIEIRA, R.H.S.F.; CARVALHO, F.C.T; REIS, E.M.F.R.; SOUSA, O.V.; VIEIRA, G.H.F.; RODRIGUES, D.P. *Salmonella* sp. e coliformes termotolerantes em sushi e sashimi comercializados na cidade de Fortaleza-Ceará. **Bol Téc Cient CEPENE**, v. 14, n. 1, p. 23-31, 2006.

RALL, V. L. M.; SFORCIN, J. M.; AUGUSTINI, V. C. M.; WATANABE, M. T.; FERNANDES JR., A.; RALL, R.; SILVA, M. G.; ARAÚJO JR., J. P. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp. Isolated from nasal cavities and hands of food handlers. **Braz J Microbiol.,** v. 41, p. 59-65, 2010.

RODRIGUES, M. X.; BITTENCOURT, J. V. M.; MATOS, E. A. S. A.; REIS, D. R. Inovação em métodos analíticos microbiológicos na indústria alimentícia. **Lat Am J of Bus**, v. 2, n. 2, p. 54-81, 2011.

ROBBINS, R.; GOULD, S.; BERGDOLL, M.S. Detecting the enterogenicity of Staphylococcus aureus strains. **Appl Microbiol.,** v.28, p. 946-950, 1974.

SANT'ANA, A.S.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D.R.P. Comparação entre os métodos rápidos simplater e petrifilm ac e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. **Ciênc Tecnol Aliment.,** n. 22, v. 1, p. 60-64, 2005.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos. **Arq. Inst. Biol.**, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

SANTOS, A.A.; SIMÕES, G.T.N.; CRUZ, M.M.; FERREIRA, N.S.S.; LIMA, R.T.C.; TUNON, G.I.L. Avaliação da qualidade microbiológica de sushi comercializado em restaurantes de Aracaju, Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 6, p. 1-5, 2012.

SANTOS, A. K. R. **Comparação entre os meios de cultura Baird-parker, Baird-parker– rpf e Petrifilm Staph Express na detecção de staphylococcus coagulase positivo em leite cru naturalmente contaminado e em leite esterilizado inoculado com culturas específicas.** 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

SCALLAN, E.; JONES, T. F.; CRONQUIST, A.; THOMAS, S.; FRENZEN, P.; HOEFER, D.; MEDUS, C.; ANGULO, F. J, FOODNET WORKING GROUP. Factors associated with seeking medical care and submitting a stool sample in estimating the burden of foodborne illness. **Foodborne Pathog Dis.,** v. 3, n. 4, p. 432-438, 2006.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S.L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M.“Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens”. **Emerg Infect Dis.,** v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.

SCHOELLER, N.; INGHAM, S.C. Comparison of the baird–parker agar and 3m petrifilmtm rapid *S. aureus* count plate methods for detection and enumeration of *Staphylococcus aureus.* **Food Microbiol.,** v. 18, n. 1, p. 581-587, 2001.

SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAUDE (SVS). Ministério da Saúde. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos**, 2014. Disponível em: http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf. Acesso em: 20 jul. 2015.

SEIXAS, F. R. F.; SEIXAS, J. R.; REIS, J. A.; HOFFMANN, F. L. Check-list para diagnóstico inicial das boas práticas de fabricação (BPF) em estabelecimentos produtores de alimentos da cidade de São José do Rio Preto (SP). **Rev Analytica**, v. 1, n. 33, p. 36-41, 2008.

SILVA, B. O.; CARAVIELLO, D. Z.; RODRIGUES, A. C.; RUEGG, L. Evaluation of petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* from milk samples. **J Dairy Sci**., v. 88, n. 8, p. 3000-3008, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. *Staphylococcus aureus*. In: SILVA, N. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo: Varela, 2007. p. 137-143.

SIRBENAGEL, K.M.; JECHOREK, R.P.; CAVER, C.N. 3M Petrifilm staph express count plate method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected dairy foods: collaborative study. **J AOAC Int.**, v.86, n.5, p.963-970, 2003.

SLEDGE, D. G.; DANIEU, P. K.; BOLIN, C. A.; BOLIN, S. R.; LIM, A.; ANDERSON, B. C.; KIUPEL, M. Outbreak of neonatal diarrhea in farmed mink kits (Mustella vison) associated with enterotoxigenic *Staphylococcus delphini.* **Vet Pathol.**, v. 47, n. 4, p.751-757, 2010.

SORIANO, J. M.; FRONT, G.; RICO, H.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Incidence of enterotoxigenic staphylococci and their toxins in foods. **J Food Prot.**, v. 65, n. 1, p. 857-60, 2002.

SOUZA, A. T. S. Certificação da qualidade de pescados. **Biológico**, v. 65, n.1, p. 11-13, 2003.

SOUZA, L. M. J. **Avaliação do sistema petrifilm™ na enumeração de micro-organismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária e patogênicos no leite de origem ovina.** 2013. 46 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

SPERBER, W. H.; TATINI, S. R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. **J Appl Microbiol.**, v. 29, n. 4, p. 502-505, 1975.

STRATTON, C.W. Coagulase-positive staphylococci. **Infect Cont,** v.3, n.1, p. 79-81, 1982. Disponível em:<http://www.jstor.org/stable/30142200>. Acesso em: 30 mar. 2015.

TANABE, T.;TOYOGUCHI, M.; HIRANO, F.; CHIBA, M.; ONUMA K.; SATO, H. Prevalence of staphylococcal enterotoxins in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogswith pyoderma and healthy dogs. **Microbiol Immunol**., v. 57, p. 651–654, 2013.

THOMAS, D.; CHOU, S.; DAUWALDER, O.; LINA, G. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Chem Immunol Allergy**., v. 93, n. 1, p. 24 – 41, 2007.

UDO, E.E.; AL-BUSTAN, M.A.; JACOB, L.E.; CHUGH, T.D. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. **Int J Med Microbiol.**, v.48, p.819-823, 1999.

VALLE. J.; GOMEZ-LUCIA, E.; PIRIZ, S.; GOYACHC. J.; ORDEN, J.A.; VADILLO. S. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Appl Environ Microbiol.,** v.56, p.1323-1326, 1990.

VASCONCELOS, N.G.; CUNHA, M.L.R. Staphylococcal enterotoxins: molecular aspects and detection methods. **J Public Health Epidemiol.,** v. 2, n. 1, p. 29-42, 2010.

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

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUYA, C.; PREVOSTB, G.; LAPEYREC, C.; BESD, M.; BRUND, Y.; FLEURETTED, J. Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **Int J Food Microbiol.,** v.30, p.271-280, 1996.

VIÇOSA, G.N., MORAES, P.M., YAMAZI, A.K., NERO, L.A. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: an evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm Staph Express count system. **Food Microbiol,.** v. 27, n. 4, p. 447-452, 2010.

VIÇOSA, G.N. **Variabilidade genética e identificação do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus* spp. isolados de leite cru e queijo frescal.** 2012. 102 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

VICTOR, R.; LACHICA, R.V.; WEISS, K.F.; DEIBEL, R.H. Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. **Appl Microbiol.,** v. 18, n. 1, p. 126–127, 1969.

VIEIRA, R. H. S. F.; SILVA, C. M.; CARVALHO, F. C. T.; SOUSA, D. B. R.; MENEZES, F. G. R.; REIS, E. M. F.; RODRIGUES, D. P. *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva em *sushi* e *sashimi* preparados em dois restaurantes da cidade de Fortaleza, Ceará. **Bol Téc Cient CEPENE.,** v. 15, n. 1, p. 9-14, 2007.

VON RHEINBABEN, K. E.; HADLOK, R. M. Rapid distinction between micrococci and staphylococci with furazolidone agars. **A van Leeuwenhoek**., v. 47, p. 41-45, 1981.

WONNACOTT, T. H.; WONNACOTT, R. J. **Introductory Statistics.** New York: John Wiley & Sons, 1969.

ZEBOVITZ, E.; EVANS, J.B.; NIVEN JR., C.F. Tellurite-glycine agar: a selective plating medium for the quantitative detection of coagulase-positive staphylococci. **J Bacteriol.,** v. 70, n. 6, p. 686 – 690, 1955.

ZHANG, C.; ZHANG, D.; YANG, J.; ZHOU, J.; HU, Q.; LING, R.; DONG, M. Comparative evaluation of the association among enumeration methods and production of enterotoxins in food-derived *Staphylococcus aureus*. **J AOAC Int.,** v. 95, n. 1, p. 105-110, 2012.

ZYGMUNT, W.A.; BROWDER, H.P.; TAVORMINA, P.A. Lytic action of lysostaphin on susceptible and resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Can J Microbiol**., v. 13, n. 1, p. 845-853, 1967.

APÊNDICE A – pH DAS AMOSTRAS DE SUSHI E FILADÉLFIA DOS RESTAURANTES A E B.

Restaurante	Semana	Amostra	Unidade Amostral	pH
A	1	*Sushi*	1	7
			2	7
			3	7
		Filadélfia	1	7
			2	7
			3	7
	2	*Sushi*	1	7
			2	7
			3	7
		Filadélfia	1	7
			2	7
			3	7
	3	*Sushi*	1	7
			2	7
			3	7
		Filadélfia	1	7
			2	7
			3	7
	4	*Sushi*	1	7
			2	7
			3	7
		Filadélfia	1	7
			2	7
			3	7
	5	*Sushi*	1	7
			2	7
			3	7
		Filadélfia	1	7
			2	7
			3	7
B	1	*Sushi*	1	7
			2	7
			3	7
		Filadélfia	1	7
			2	7
			3	7
	2	*Sushi*	1	7
			2	7
			3	7
		Filadélfia	1	7
			2	7
			3	7
	3	*Sushi*	1	7
			2	7
			3	7
		Filadélfia	1	7
			2	7
			3	7
	4	*Sushi*	1	7
			2	7
			3	7
		Filadélfia	1	7
			2	7
			3	7
	5	*Sushi*	1	7
			2	7
			3	7
		Filadélfia	1	7
			2	7
			3	7

APÊNDICE B – ENUMERAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA NAS AMOSTRAS DE SUSHI E FILADÉLFIA DO RESTAURANTE A.

Semana	Amostra	Unidade Amostral	Contagem (UFC/g)	
			Petrifilm™ Staph Express	**Ágar *Baird-Parker***
1	*Sushi*	1	$1,45x10^2$	< 100
		2	$5,50x10^1$	< 100
		3	$2,50x10^1$	< 100
	Filadélfia	1	$9,50x10^1$	< 100
		2	$1,00x10^1$	< 100
		3	$1,50x10^2$	< 100
2	*Sushi*	1	$1,45x10^2$	< 100
		2	$1,10x10^2$	< 100
		3	$1,10x10^2$	< 100
	Filadélfia	1	$2,10x10^3$	< 100
		2	$3,90x10^3$	< 100
		3	$3,50x10^2$	< 100
3	*Sushi*	1	$6,00x10^2$	< 100
		2	$2,45x10^2$	< 100
		3	$7,00x10^2$	< 100
	Filadélfia	1	$1,50x10^3$	< 100
		2	$5,50x10^2$	< 100
		3	$7,00x10^2$	< 100
4	*Sushi*	1	< 10	< 100
		2	< 10	< 100
		3	< 10	< 100
	Filadélfia	1	< 10	< 100
		2	< 10	< 100
		3	< 10	< 100
5	*Sushi*	1	< 10	< 100
		2	$5,80x10^2$	$5,00x10^1$
		3	< 10	< 100
	Filadélfia	1	$6,00x10^2$	< 100
		2	$8,00x10^2$	< 100
		3	$1,65x10^3$	< 100

APÊNDICE C – ENUMERAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA NAS AMOSTRAS DE SUSHI E FILADÉLFIA DO RESTAURANTE B.

Semana	Amostra	Unidade Amostral	Contagem (UFC/g)	
			Petrifilm™ Staph Express	**Ágar *Baird-Parker***
1	*Sushi*	1	$2,05x10^2$	< 100
		2	$7,50x10^1$	< 100
		3	$1,00x10^2$	< 100
	Filadélfia	1	$2,55x10^2$	< 100
		2	< 10	< 100
		3	$2,05x10^2$	< 100
2	*Sushi*	1	$3,00x10^2$	$1,00x10^2$
		2	$2,00x10^2$	< 100
		3	$1,85x10^2$	< 100
	Filadélfia	1	$7,00x10^2$	< 100
		2	$6,00x10^2$	< 100
		3	$8,50x10^1$	< 100
3	*Sushi*	1	$3,50x10^1$	< 100
		2	$9,00x10^1$	< 100
		3	$1,70x10^2$	< 100
	Filadélfia	1	< 10	< 100
		2	$1,45x10^2$	< 100
		3	< 10	< 100
4	*Sushi*	1	< 10	< 100
		2	< 10	< 100
		3	< 10	$1,00x10^2$
	Filadélfia	1	$2,20x10^2$	< 100
		2	< 10	< 100
		3	$1,30x10^2$	$6,90x10^3$
5	*Sushi*	1	$4,50x10^2$	< 100
		2	$2,75x10^2$	$5,00x10^2$
		3	$7,00x10^2$	< 100
	Filadélfia	1	$6,20x10^2$	< 100
		2	$3,40x10^2$	< 100
		3	$1,70x10^2$	< 100