

KELLY CRISTINA DA SILVA BRABES

**IDENTIFICAÇÃO E CAPACIDADE DE ADESÃO DE *Staphylococcus* spp.
ISOLADOS DE MANIPULADORES, SUPERFÍCIES E AR DE
AMBIENTES DE UMA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B795i
2005

Brabes, Kelly Cristina da Silva, 1973-
Identificação e capacidade de adesão de
Staphylococcus spp. isolados de manipuladores, superfícies
e ar de ambientes de uma indústria de laticínios / Kelly
Cristina da Silva Brabes. – Viçosa : UFV, 2005.
xvi, 83f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Nélio José de Andrade.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 69-80.

1. Bactérias - Adesão. 2. Estafilococos. 3. Indústria de
laticínios – Aspectos sanitários. 4. Alimentos – Indústria -
Aspectos da saúde. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

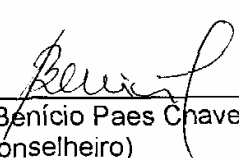
CDD 22.ed. 664.001579

KELLY CRISTINA DA SILVA BRABES

**IDENTIFICAÇÃO E CAPACIDADE DE ADESÃO DE *Staphylococcus* spp.
ISOLADOS DE MANIPULADORES, SUPERFÍCIES E AR DE
AMBIENTES DE UMA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

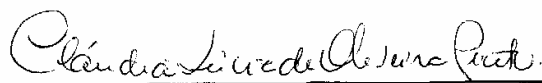
APROVADA: 29 de agosto de 2005.



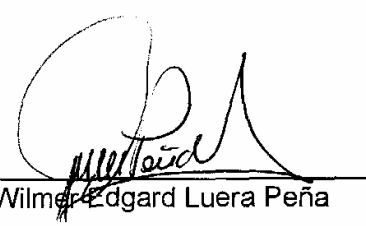
Prof. José Benício Paes Chaves
(Conselheiro)



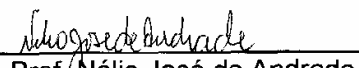
Prof. Regina Célia Santos Mendonça
(Conselheira)



Dr.ª Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto



Dr. Wilmer Edgard Luera Peña



Prof. Nélio José de Andrade
(Orientador)

A Deus, sempre presente, pela interminável fé.

À Santa Rita de Cássia, minha protetora.

Ao Rafael Henrique, meu amor, pelo carinho, pela compreensão, pelo apoio, pela perseverança e pela insistência e, acima de tudo, pela presença em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, e sem o qual a desistência tornaria realidade.

Aos meus pais, exemplos de caráter, fé e amor, que me ensinaram que a presença de Deus torna o homem uma criatura especial, apesar de suas fraquezas e erros cometidos na vida. Nada é por acaso.

*Ó poderosa e gloriosa Santa Rita, chamada Santa dos impossíveis,
advogada dos casos desesperados, auxiliadora da última hora, refúgio e
abrigo da dor que arrasta para o abismo do pecado e da desesperação, com
toda a confiança no vosso poder junto ao Coração Sagrado de Jesus, a Vós
recorro no caso difícil e imprevisto, que dolorosamente oprime o meu
coração.*

*Obtende-me a graça que desejo, pois, sendo-me necessária, a quero.
Apresentada por vós a minha oração, o meu pedido, por vós que sois tão
amada por Deus, certamente serei atendida. Dizei a Nosso Senhor que me
valerei da graça para melhorar a minha vida e os meus costumes e para
cantar na terra e no céu a divina misericórdia.*

*"Não é o desafio com que nos deparamos
que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a
maneira com que respondemos ao desafio.
Somos combatentes, idealistas,
mas plenamente conscientes.
Porque o ter consciência não nos obriga a ter teoria sobre as coisas: só
nos obriga a sermos conscientes.
Problemas para vencer, liberdade para provar.
E, enquanto acreditarmos no nosso sonho,
nada é por acaso."
(Henfil)*

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pela oportunidade concedida para a realização deste curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), que financiou esta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao orientador, professor Nélio José de Andrade, pela oportunidade, paciência, compreensão e pelos profundos ensinamentos proporcionados.

À professora Regina Célia Santos Mendonça, de quem, dentre outros fatores, me lembrarei principalmente pela amizade e convivência feliz em uma última etapa. Poderíamos ter nos conhecido antes.

À professora Célia Alencar de Moraes, pela simpatia, pelos ensinamentos e pelas sugestões.

Aos professores José Benício Paes Chaves, Dr. Wilmer Edgard Luera Pena e Dr^a Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, pesquisadora da EPAMIG, pela contribuição.

Ao Laticínio Funarbe, principalmente à Maria Helena e ao Luiz Sampaio que me permitiram obter as amostras do experimento, mas, também, me forneceram a oportunidade de conhecer funcionários que transformaram o humor matinal deste grande projeto.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e a Universidade Paranaense (Unipar), por me apresentarem condições de conhecer um lado diferente do ensino, o ser professor, onde aprendi que não basta buscar o conhecimento para si. Esta busca se finaliza quando conseguimos passá-lo para os outros, como um dia foram passados para nós.

Aos funcionários do DTA, Carlinhos, Tomás (Perereca) e Sr. Lelé, que sempre resolveram meus pequenos problemas, principalmente aqueles relacionados ao funcionamento mecânico do Laboratório, minha sincera gratidão.

Aos funcionários administrativos Geralda, Adão, Juarez, Vaninha, Maria Rita, Sr. Luiz e Sr. Manoel, pela simpatia do dia-a-dia.

Aos funcionários da FUNARBE, através da Madalena, do Antônio e da Patrícia, que administraram meus gastos, por isso todos os itens necessários foram adquiridos.

Aos amigos e colegas de curso, Angélica, Patrícia, Keily, Cleusa, Aurélia, Cleuber e Sílvia, Carolina, Marcelo, Barôncio, Fernandinha, Elizângela, Marciana e Valéria, pela amizade, pela ajuda e, principalmente, pela convivência.

Aos meus ajudantes do dia-a-dia desta pesquisa, Fernandinha, Júca/Júnia e Line, pela realização minuciosa do experimento, ao qual contribuíram com “sangue” e suor.

Às sempre amigas Cris, Margô, Deby e Eliz, que me ouviram e confiaram em mim em toda esta etapa. Vocês estão sempre presentes. Não posso esquecer também da Mari, do Tom (André Luiz) e do Emmanuel.

Aos meus novos amigos de trabalho e luta pela perfeição, Eliane Dalva Godoi Danesi e Gisele Letícia Alves (UEM/Umuarama). Muitas vezes a luta é apenas uma batalha, e a sobrevivência indica que a luta não acabou. Onde quer que estejamos o nosso encontro na vida não terá sido em vão.

Aos outros novos amigos, Gilberto Alves, Maria Cristina Correa, Rosi Toesca, Jaqueline Bom Reghin, Jussara Toledo, Luiz Sérgio Merlini, todos professores e amigos de uma nova etapa da vida.

Aos colegas de disciplina, que apesar do estresse nós sempre nos divertíamos.

Aos demais professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos e pela excelente convivência.

Aos meus pais, Armando e Maria de Lourdes. Obrigada mãe.

Aos meus sogros, Maurício e Ângela, pela constante presença.

Aos meus irmãos, Márcia, Alex, Regina e Renata.

Aos meus sobrinhos, Mayara e Lucas Brabes Mazetto. A tia ama muito vocês.

Especialmente dedico àquele ou àquela que ainda não está aqui em minha vida, mas que se Deus permitir em breve estará. Para quem volto todo meu pensamento, amor e fé.

A todos que contribuíram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

KELLY CRISTINA DA SILVA BRABES, filha de Armando Brabes e Maria de Lourdes da Silva Brabes, nasceu em São Paulo, São Paulo, em 29 de dezembro de 1973.

Em agosto de 1991, ingressou na antiga Escola Superior de Agricultura de Lavras, no curso de Agronomia.

Em 1992, transferiu-se para o curso de Zootecnia, colando grau em 25 de janeiro de 1997.

Em fevereiro de 1997, foi selecionada pelo Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Ciência de Alimentos, na Universidade Federal de Lavras, desenvolvendo estudos na área de Microbiologia de Alimentos, concluindo a defesa de dissertação em 25 de junho de 1999.

Em agosto de 1999, foi selecionada pelo Programa de Pós-Graduação em nível de Doutorado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, desenvolvendo estudos na área de Higiene de Alimentos.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Estafilococos em indústria de laticínios: patogenicidade	6
2.2. Avaliação de ar de ambientes.....	10
2.3. Avaliação de superfícies de equipamentos utilizados na indústria de alimentos	16
2.4. Avaliação de manipuladores de alimentos	17
2.5. Identificação de <i>Staphylococcus</i> spp.....	20
2.6. Surtos de doenças transmitidas por alimentos	22
2.7. Produção de enterotoxinas estafilocócicas	23
2.8. Adesão microbiana e formação de biofilme.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Avaliação da ocorrência de estafilococos em uma indústria de processamento de leite e derivados	37
3.1.1. Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. em amostras de ar de ambientes de processamento	37
3.1.2. Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. em amostras de superfícies de processamento	38
3.1.3. Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. nas mãos de manipuladores de alimentos	39

	Página
3.2. Isolamento e identificação bioquímica de estafilococos isolados de amostras de ar de ambientes, superfícies de equipamentos e das mãos dos manipuladores.....	40
3.3. Produção e caracterização de enterotoxinas de estafilococos isolados de amostras de ar de ambientes, superfícies de equipamentos e mãos de manipuladores	42
3.3.1. Produção de enterotoxinas estafilocócicas.....	42
3.3.2. Caracterização das enterotoxinas	43
3.4. Capacidade de adesão de estafilococos isolados de ar de ambientes, superfícies de equipamentos e mãos de manipuladores em superfícies de processamento	44
3.4.1. Microrganismos e superfícies avaliadas.....	44
3.4.2. Determinação da adesão	45
3.4.3. Determinação do número de <i>Staphylococcus</i> spp. aderidos pela técnica de microscopia de epifluorescência	45
3.5. Análise dos resultados	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1. Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. em amostras de ar de ambientes de processamento, superfícies de equipamentos e das mãos de manipuladores em uma unidade de processamento de uma indústria de laticínios	48
4.2. Isolamento e identificação bioquímica de estafilococos isolados de amostras de ar de ambientes, superfícies de equipamentos e das mãos dos manipuladores.....	52
4.3. Produção e caracterização de enterotoxinas de estafilococos isolados de ar de ambientes, superfícies de equipamentos e das mãos dos manipuladores	56
4.4. Adesão de isolados de estafilococos de amostras de ar de ambientes, superfícies de equipamentos e das mãos dos manipuladores.....	59
5. CONCLUSÕES	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
7. APÊNDICE	81

LISTA DE TABELAS

	Página
1	Recomendação da <i>American Public Health Association</i> para o controle microbiológico ambiental, com base no número de partículas toleráveis em função da classe de limpeza 15
2	Números máximos aceitáveis de microrganismos por m ³ de ar, em função do tempo de exposição e da dimensão da abertura do recipiente de embalagem..... 15
3	Recomendações microbiológicas para mesófilos aeróbios em ambientes, equipamentos e utensílios, propostas por alguns pesquisadores 18
4	Composição do meio de suspensão e dos reagentes de leitura . 41
5	Logaritmo da contagem do número de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados do ar dos ambientes de processamento, da superfície dos equipamentos e das mãos dos manipuladores em uma indústria de laticínios e seus respectivos desvios-padrão 49
6	Porcentagem de isolados identificados e índice de confiabilidade de espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. provenientes da unidade de processamento do laticínio 55
7	Identificação e classificação das enterotoxinas produzidas por espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos por teste imunológico SET-RPLA 57
8	Logaritmo (UFC.cm ⁻²) do número de células de <i>Staphylococcus</i> spp. aderidas em diferentes superfícies 60

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Esquema e princípio de funcionamento de um amostrador de ar (A) e foto do equipamento Air sampler MAS – 100 (B) (Merck®, 2005)	14
2 Modelo de galeria de identificação API STAPH	41
3 SET-RPLA (OXOID®) e um modelo de placa de Elisa Inoculadas com espécies de <i>Staphylococcus</i> spp.	44
4 Adesão em superfície de polipropileno de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> (A), <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (B), <i>Staphylococcus xylosus</i> (C) e <i>Staphylococcus epidermidis</i> (D), crescidas em cultura pura, em caldo BHI a 30 °C, por 24 horas. Visualização por microscopia de epifluorescência, em microscópio LEICA DC 300F	62
5 Adesão em superfície de polietileno de baixa densidade de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> (A), <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (B), <i>Staphylococcus xylosus</i> (C) e <i>Staphylococcus epidermidis</i> (D), crescidas em cultura pura, em caldo BHI a 30 °C, por 24 horas. Visualização por microscopia de epifluorescência, em microscópio LEICA DC 300F.....	63
6 Adesão em superfície de vidro de isolados de <i>Staphylococcus xylosus</i> (A), <i>Staphylococcus aureus</i> (B), <i>Staphylococcus epidermidis</i> (C) e <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (D), crescidas em cultura pura, em caldo BHI a 30 °C, por 24 horas. Visualização por microscopia de epifluorescência, em microscópio LEICA DC 300F	64

7	Adesão em superfície de aço inoxidável AISI 304, #4 de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> (A), <i>Staphylococcus xylosus</i> (B), <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (C) e <i>Staphylococcus epidermidis</i> (D), crescidas em cultura pura, em caldo BHI a 30 °C, por 24 horas. Visualização por microscopia de epifluorescência, em microscópio LEICA DC 300F.....	65
---	---	----

RESUMO

BRABES, Kelly Cristina da Silva, D.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2005. **Identificação e capacidade de adesão de *Staphylococcus* spp. isolados de manipuladores, superfícies e ar de ambientes de uma Indústria de laticínios.** Orientador: Nélio José de Andrade. Conselheiros: Regina Célia Santos Mendonça e José Benício Paes Chaves

O objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência de *S. taphylococcus* spp. no ar, nas superfícies de equipamentos e nas mãos de manipuladores de ambientes de recepção, pasteurização, embalagem e produção de doce de leite, manteiga, queijos e iogurtes de um laticínio. A técnica de impressão em ágar foi empregada para quantificar o grau de contaminação do ar. A técnica de *swab* foi empregada para a contagem desses microrganismos nas superfícies e nas mãos dos manipuladores. Estafilococos isolados dos ambientes foram identificados e submetidos ao teste de produção e identificação de enterotoxinas SET-RPLA (OXOID[®]) dos tipos A, B, C e D. A capacidade de adesão de quatro espécies de estafilococos produtores e pauciprodutores de enterotoxinas foi avaliada em superfícies de polipropileno, polietileno de baixa densidade, aço inoxidável AISI 304 #4 e vidro, por meio de microscopia de epifluorescência. Não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias do logaritmo do número médio de *Staphylococcus* spp. para o ar dos ambientes, cujo número atingiu $0,6 \log \text{ UFC.m}^{-3}$. Essa diferença também não foi constatada para superfícies ($1,01 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$) e

para mãos dos manipuladores ($1,83 \log \text{ UFC.mão}^{-1}$). Dos 137 isolados de *Staphylococcus* spp., 46 foram provenientes do ar, 40 das superfícies e 51 das mãos dos manipuladores. As espécies mais freqüentes, acima de 10% do total de isolados, no ar e nas superfícies foram *S. xylosus*, *S. lentus* e *S. aureus*. Os isolados das mãos dos manipuladores, de *S. epidermidis*, além de *S. aureus* e *S. xylosus*, foram também identificados com porcentual acima de 10%. Dezesete isolados (12,4%) produziram pelo menos um dos tipos de enterotoxina. Isolados coagulase negativa de *S. haemolyticus*, *S. sciuri* e *S. saprophyticus* provenientes do ar produziram toxinas A, B C e D; entretanto, *S. epidermidis* produziu os tipos A e D, e uma outra estirpe produziu os tipos A, C e D. As espécies *S. lugdunensis*, *S. capitis* e *S. xylosus*, isoladas de equipamentos, também coagulase negativa, produziram todos os tipos de toxina. *S. hominis*, isolado das mãos dos manipuladores, produziu as toxinas A, B e C, enquanto o isolado de *S. capitis* produziu os quatro tipos. Dentre os três isolados de *S. epidermidis*, um não produziu a toxina tipo C, e as demais produziram os tipos A, B, C e D. Para os estudos de adesão selecionaram-se *S. epidermidis*, isolado do ar do ambiente, e *S. xylosus*, isolado da superfície dos equipamentos, ambos produtores das quatro enterotoxinas, além de dois isolados das mãos dos manipuladores; um deles, *S. saprophyticus*, produtor de quatro enterotoxinas, e o outro, *S. aureus*, não-produtor de toxina. Observou-se que os isolados aderiram a todas as superfícies avaliadas. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no grau de adesão para as superfícies, constatando-se médias de $5,75 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ e $5,68 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$, $5,87 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ e $5,84 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ para polipropileno, polietileno de baixa densidade, aço inoxidável AISI 304 #4 e vidro, respectivamente. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) quanto ao grau de adesão dos microrganismos avaliados. *S. epidermidis* apresentou menor capacidade de adesão em polietileno de baixa densidade ($5,16 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$) e os isolados *S. aureus* ($5,88 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$), *S. xylosus* ($5,97 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$) e *S. saprophyticus* ($5,72 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$) não diferiram entre si.

ABSTRACT

BRABES, Kelly Cristina da Silva, D.S., Universidade Federal de Viçosa, July 2005. **Identification and the ability to adhere of *Staphylococcus spp. species* isolated of the manipulators hands, food contact surfaces and environmental air in a dairy plant.** Adviser: Nélio José de Andrade. Committe Members: Regina Célia Santos Mendonça and José Benício Paes Chaves

Staphylococcus spp. isolated in the air, in the food contact surfaces and in the manipulators at processing areas in a dairy plant, including milk reception, packaging, and pasteurization rooms, rooms where cheese, yogurt, butter and “doce de leite” (*Latin American typical treat made of concentrated milk and sugar*), were evaluated. The impression technique in agar using air sampler was used to quantify the degree of contamination of the air, in UFC.m⁻³. For the swab technique was determined the counting of those microorganisms in the surfaces, expressed in UFC.cm⁻² and in the manipulators expressed in UFC/hand. The staphylococci isolated of air were submitted the biochemical identification by the system API Staph (BIOMERIEUX®) and the to the production and identification of enterotoxins test SET-RPLA (OXOID®), that it detects the types A, B, C and D of the enterotoxins. Also, It was evaluated the ability of adhesion of four species of producing staphylococci and low-enterotoxin-producing, based in their identification with biochemical characteristics, above 90% degree of identification, in polypropylene, low

density polyethylene, stainless steel AISI 304 #4 and glass surfaces, by using epifluorescence microscopy (LEICA DC 300F). There were not differences ($p>0.05$) between the averages of the logarithm of the number of *Staphylococcus* spp. for the air, with average of $0.6 \log \text{ UFC.m}^{-3}$. That difference, also, was not significant for surfaces ($1.01 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$) and for manipulators ($1.83 \log \text{ UFC.mão}^{-1}$). For the 137 isolated of *Staphylococcus* spp., only 46 were from the air, 40 of the surfaces and 51 of the manipulators. Above 10%, the most frequent species, in the air and in the surfaces they were *S. xylosus*, *S. lentus* and *S. aureus*. For manipulators, the species *S. epidermidis*, besides *S. aureus* and *S. xylosus* were also identified with percentage above 10%. Seventeen isolated (12.4%) produced at least one of the enterotoxin types. In the air, the isolated negative coagulase *S. haemolyticus*, *S. sciuri* and *S. saprophyticus* produced toxins A, B C and D. The *S. epidermidis* produced the types A and D and another strains produced the types A, C, D. For the surfaces of equipments, the species *S. lugdunensis*, *S. capitis* and *S. xylosus* also negative coagulase produced all of the toxin types. In the manipulators' hands, to the isolated identified like *S. hominis* produced three types of toxins A, B, C while isolated *S. capitis* produced the four identified types for the method. By the way three of the isolated of *S. epidermidis*, only one did not produce the toxin type C, while the others produced the types A, B, C and D. For the adhesion studies they were selected isolated *S. epidermidis* obtained of the atmosphere air, *S. xylosus* originating from surface of equipments, both producing four enterotoxinas types, besides isolated from manipulators; one was *S. saprophyticus*, producing of four enterotoxins and another was *S. aureus* no toxin producer. All the isolated adhered to the surfaces evaluated. There was not difference ($p>0.05$) for the adhesion in the surface e evaluated with averages of $5.75 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ and $5.68 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$, $5.87 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ and $5.84 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ for polypropylene, polyethylene of low density, stainless steel ASI 304 #4 and glass, respectively. There was difference ($p<0.05$) in the adhesion of the microorganisms evaluated. *S. epidermidis* presented lower adhesion capacity in polyethylene of low density ($5.16 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$), isolated *S. aureus* ($5.88 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$) and *S. xylosus* ($5.97 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$) and *S. saprophyticus* ($5.72 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$), they did not differ amongst themselves.

1. INTRODUÇÃO

A segurança dos alimentos constitui preocupação para consumidores, indústria de alimentos e órgãos responsáveis pela saúde pública. Apesar dos recentes avanços tecnológicos e científicos, observa-se ainda alta incidência de doenças de origem alimentar. Muitas delas podem ser contraídas por ingestão de alimentos contaminados, sendo os principais agentes etiológicos as bactérias, os fungos, os vírus, os parasitas, os agentes químicos, além de substâncias tóxicas.

As bactérias representam o grupo de maior importância, sendo associadas a 70% dos surtos e a 95% dos casos de doenças de origem alimentar. Dentre as toxinfecções alimentares, a intoxicação estafilocócica tem como causa a ingestão de enterotoxinas pré-formadas nos alimentos durante o crescimento de espécies de *Staphylococcus* spp. Frequentemente esses microrganismos podem colonizar a pele das mãos, as fossas nasais superiores dos manipuladores e as superfícies de equipamentos e utensílios, podendo ser incorporados aos alimentos durante o seu preparo.

Uma preocupação constante das indústrias de alimentos é com a qualidade dos procedimentos de higienização do ar dos ambientes de processamento e das superfícies de equipamentos e utensílios, bem como com as condições higiênicas dos manipuladores que participam do processamento dos alimentos. O ar do ambiente em uma indústria de alimentos também pode levar à contaminação do produto final, em razão do grau e do tipo de

contaminação, o que depende das condições higiênicas do ambiente e do tempo em que o produto permanece exposto. A qualidade do ar na indústria de alimentos afeta diretamente a segurança microbiológica e a manutenção da qualidade. Os produtos lácteos são particularmente sensíveis à contaminação por microrganismos presentes no ar.

O contato direto entre os alimentos, os equipamentos e utensílios e os manipuladores ou funcionários na linha de processamento vem recebendo atenção especial em programas de controle de higiene para obtenção de alimentos seguros ao consumo. Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), os manipuladores de alimentos representam uma das principais fontes de contaminação, sendo a causa de, aproximadamente, 26% dos surtos.

Pesquisas demonstram que a produção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos não é restrita à espécie *S. aureus*. Outras espécies são capazes de produzir a enzima coagulase, incluindo *S. intermedius* e *S. hyicus*. Além disso, algumas espécies não-produtoras de coagulase também produzem enterotoxinas, em menores concentrações, em comparação às espécies coagulase positivas, também associadas à intoxicação alimentar. Entretanto, a legislação brasileira considera na análise de estafilococos em alimentos apenas as espécies coagulase positivas, o que é preocupante diante dos dados da literatura.

Os processos de adesão microbiana e de formação de biofilmes que ocorrem na indústria de alimentos são associados à deposição de microrganismos em uma superfície de contato, onde se fixam e iniciam o seu crescimento. Os biofilmes causam problemas à indústria de alimentos, como corrosão nas superfícies, diminuição de transferência de calor em trocadores, além de serem fontes de microrganismos alteradores, ou de microrganismos patogênicos. A análise das microtopografias das superfícies usadas no processamento demonstra a ocorrência de imperfeições ou fissuras que apresentam dimensões suficientes para alojar microrganismos que podem desencadear o processo de adesão e formação de biofilmes.

Os objetivos deste trabalho foram:

a) quantificar e isolar espécies de *Staphylococcus* spp. de amostras do ar dos ambientes, das superfícies de equipamentos e das mãos dos manipuladores na indústria de laticínios;

b) Identificar as espécies de *Staphylococcus* spp. produtoras e as não-produtoras de enterotoxinas;

c) avaliar a capacidade de adesão de isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes do ar, das superfícies de equipamentos e dos manipuladores em superfícies de uso comum na indústria de laticínios;

d) fornecer subsídios à indústria de laticínios para o controle da ocorrência de contaminação por estafilococos; e

e) fornecer subsídios aos órgãos responsáveis pela legislação quanto à melhor metodologia para detecção de estafilococos enterotoxigênicos em alimentos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A qualidade higiênico-sanitária constitui fator essencial à segurança dos alimentos disponibilizados aos consumidores, o que significa que a garantia da qualidade desses produtos requer o monitoramento durante todo o processo produtivo. Assim, a indústria alimentícia deve agir de forma preventiva nas diversas etapas da cadeia produtiva dos alimentos, atuando em pontos onde é possível eliminar ou controlar as contaminações físicas, químicas e biológicas, que representam riscos à saúde pública, além de estarem associadas à redução de vida-de-prateleira dos produtos, aos problemas de qualidade e às perdas econômicas.

A higiene dos alimentos tem como objetivo principal a aplicação de métodos para produção e preparo seguros dos alimentos no que se refere aos aspectos físicos, químicos e microbiológicos, além de auxiliar na manutenção das suas qualidades sensorial e nutricional.

O ar dos ambientes de produção de uma indústria de alimentos tem sido reportado como fonte de contaminação, uma vez que microrganismos aderidos às partículas de ar podem ser transportados até os alimentos e as superfícies de equipamentos (SALUSTIANO *et al.*, 2003).

A importância da transmissão de doenças infecciosas por meio de contato com as mãos de manipuladores foi demonstrada em 1938, por Price (ALMEIDA *et al.*, 1995), que ao estudar bactérias presentes na pele encontrou tanto bactérias gram-negativas, facilmente removidas pelo uso de detergentes,

como bactérias gram-positivas, principalmente saprófitas, que ficam alojadas nas reentrâncias da pele, onde são encontrados também resíduos principalmente de lipídeos, que são utilizados como fonte de nutrientes para seu crescimento. Dentre os microrganismos gram-positivos destacam-se as espécies de *Staphylococcus*, algumas delas produtoras de enterotoxinas, que são contaminantes indesejáveis dos alimentos, por causarem intoxicações eméticas no homem.

Almeida *et al.* (1995), em estudo envolvendo 102 manipuladores de alimentos de diversas faixas etárias, constataram que 35 eram portadores de *Staphylococcus aureus* e que dentre os isolados 19 eram produtores de enterotoxinas.

As superfícies podem representar fontes de contaminação quando não higienizadas adequadamente, muitas vezes iniciando processos de adesão a partir de partículas de sujidades e de microrganismos não removidos pelos procedimentos corretos de higienização. Vários tipos de superfícies de diferentes materiais podem estar envolvidos como causas de surtos de doenças de origem alimentar, como aço inoxidável AISI 304 #4, vidro, borracha, polietileno, polipropileno, poliuretano, silicone, poli (cloreto de vinila), granito, mármore e misturas de liga de ferro (SILVA *et al.*, 2003).

A presença de *Staphylococcus* spp. em alimentos, provenientes de várias fontes de contaminação, representa um risco à saúde do consumidor. As principais fontes de contaminação desses microrganismos incluem a matéria-prima, o ar dos ambientes que envolvem os alimentos, as superfícies e os manipuladores. A legislação brasileira, através da Resolução RDC nº 12 (BRASIL, 2001), referente aos padrões microbiológicos de alimentos, exige a pesquisa de estafilococos coagulase positivos no alimento para indicar risco de veiculação de enterotoxinas estafilocócicas. No entanto, Silva e Gandra (2004) demonstraram o envolvimento de espécies coagulase negativas em surtos de doenças de origem alimentar.

2.1. Estafilococos em indústria de laticínios: patogenicidade

Freqüentemente os alimentos de origem animal, especialmente o leite e derivados, são associados a surtos de intoxicação alimentar, o que representa um grande problema para a saúde pública. O gênero *Staphylococcus*, um dos principais agentes etiológicos da mastite bovina e contaminante de manipuladores, ambientes e superfícies da indústria de alimentos, é importante agente causador de intoxicação por alimentos em virtude de sua capacidade de produção de enterotoxinas. *Staphylococcus aureus* é motivo de preocupação em função da sua capacidade de aderência no interior da glândula mamária, o que dificulta a ação de antibióticos em animais mastíticos, representando, assim, uma das fontes de contaminação do leite (ZSCHÖCK *et al.*, 2005).

Falhas ocorridas durante a ordenha e no processamento do leite e derivados, aliadas às temperaturas inadequadas de conservação em comércios varejistas, têm contribuído para a comercialização dos produtos lácteos com qualidade microbiológica insatisfatória. No Brasil, é comum a comercialização de leite cru e queijos produzidos a partir de leite cru, ainda que essas práticas não sejam permitidas. O leite pasteurizado também pode apresentar contaminação por *Staphylococcus* spp. e, ou, por outras espécies microbianas, além de produtos de seu metabolismo, dependendo da qualidade do leite cru e das condições de processamento (GOMES e GALLO, 1995; GONZALEZ *et al.*, 2004).

Para a indústria, esse é um aspecto importante, pois o problema encontrado no campo reflete um prejuízo para a própria indústria e também para a saúde humana, já que esses microrganismos são relacionados com surtos de intoxicação de origem alimentar. Quando o leite é submetido a tratamento térmico adequado, espécies de *Staphylococcus* são inativadas, pois o microrganismo é considerado termolábel (WENDPAP *et al.*, 1997; BRITO *et al.*, 1998).

O primeiro registro de estafilococos como agente de doenças piogênicas no homem ocorreu em 1880, na Escócia, por Alexander Ogston. Esses microrganismos foram denominados de *Staphylococcus*, nome derivado do grego, em que *staphyle* significa cacho de uvas e *coccus*, grão de semente (BAIRD-PARKER, 1989).

Produtos lácteos em desacordo com os padrões vigentes (BRASIL, 2001) quanto à contaminação com estafilococos coagulase positivo são freqüentemente reportados em pesquisas, indicando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias no leite pasteurizado. Em um estudo com 70 amostras de leite pasteurizado dos tipos B, C e reconstituído, foram constatadas bactérias mesófilas e *S. aureus* acima dos limites legais vigentes (NASCIMENTO *et al.*, 1991). Resultados semelhantes foram constatados por Gómez *et al.* (1983), ao avaliarem as condições microbiológicas de queijo "minas frescal".

As alterações que a mastite por *S. aureus* e espécies coagulase negativas causam no leite a ser industrializado foram relatadas por Nicolau *et al.* (1996). Os autores observaram aumento nos valores médios de pH, teor de cloretos e número de leucócitos polimorfonucleares e diminuição nos valores médios de acidez, densidade, teor de gordura, extrato seco total e desengordurado, crioscopia e caseína. As enterotoxinas produzidas por esse organismo são termoestáveis e associadas a surtos (MARSHALL, 1992, PEREIRA *et al.*, 2001). Estirpes enterotoxigênicas de *S. aureus* foram isoladas de tetos de vacas com mastite (FREITAS e MAGALHÃES, 1990; GONZALEZ, *et al.*, 2004; ZSCHÖCK *et al.*, 2005). Takeuchi *et al.* (1998) e Cardoso *et al.* (2000) verificaram que algumas estirpes isoladas de animais com mastite produziram toxinas capazes de provocar a "síndrome de choque tóxico".

Em 1959, Omori e Kato, citados por Pereira (1996) descreveram um primeiro caso de intoxicação emética em uma escola secundária, em Osaka, no Japão, envolvendo 40 estudantes, em que o agente etiológico era estafilococo coagulase negativo.

Outro surto ocorrido e notificado por Breckinridge e Bergdoll (1971) envolveu 264 pessoas que participaram de um banquete em 1969, nos Estados Unidos, em que foi detectada nos alimentos a presença de *S. epidermidis produtor* de enterotoxina estafilocócica tipo A (SEA).

Na literatura há relato de surto associado à ingestão de baixas concentrações de enterotoxina presentes em leite achocolatado, contendo apenas 0,4 a 0,7 ng.mL⁻¹ de toxina SEA (EVENSON *et al.*, 1996).

No Brasil, diversos surtos de intoxicações estafilocócicas são descritos. Carmo e Bergdoll (1990) relataram um surto em Belo Horizonte-MG, em que 60

peessoas, que consumiram bolo recheado com creme e queijo, apresentaram sintomatologia compatível com a intoxicação emética. Os alimentos envolvidos apresentaram contagem bacteriana entre 10^4 UFC.g⁻¹ e 10^8 UFC.g⁻¹, e as toxinas encontradas foram dos tipos A e B. Outro surto ocorreu em 1993, em que 108 pessoas apresentaram simultaneamente quadro característico de intoxicação estafilocócica e gastroenterite por salmonelose, aproximadamente, 6 a 15 horas após o consumo de salada de batata contaminada com estirpes de *S. aureus*, produtoras de toxinas A e B, além da presença de *Salmonella enteritidis* (CARMO *et al.*, 1996).

Pereira (1996) relatou um surto envolvendo queijo tipo "minas frescal" contaminado com $2,9 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ de células de *S. aureus*. O autor constatou a presença de colônias atípicas em ágar Bair-Parker, negativas para lecitinase e lipase, produtoras de 80 ng.mL⁻¹ de enterotoxina tipo H. Esta informação é relevante, considerando que uma das características associadas à enterotoxicidade dos estafilococos é a formação de halo transparente, em função da ação da lecitinase e da lipase, sob a lecitina presente em ágar Baird-Parker (CASMAN e BENNETT, 1965; BAIRD-PARKER, 1989; BRASIL, 2001).

Rodrigues *et al.* (2004) relataram o surto envolvendo 56 pessoas, associado ao consumo de sanduíche de carne de frango contaminado com 2×10^8 UFC.g⁻¹ e presença de enterotoxina. Outro surto de intoxicação estafilocócica foi relatado por Carmo *et al.* (2003), também com contagem de 2×10^8 UFC.g⁻¹ e presença das enterotoxinas dos tipos A, B e D em panquecas de frango.

As enterotoxinas estafilocócicas A e D são as mais envolvidas em surtos de intoxicação alimentar, podendo estar presentes de forma isolada ou associadas. De acordo com *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (HOLT *et al.*, 1994), a maioria das estirpes produz enterotoxina tipo A. A importância da detecção das toxinas estafilocócicas está no fato de elas causarem intoxicações alimentares graves, como a síndrome de choque tóxico (CRASS e BERGDOLL, 1986).

A produção de toxinas por outras espécies de *Staphylococcus* é mencionada com frequência na literatura (BERGDOLL, 1990; SILVA e GANDRA, 2004), principalmente as espécies *S. hyicus* e *S. intermedius*.

Existem kits comerciais sensíveis para detecção de enterotoxinas. O policlonal tipo "sanduíche" ou SET-ELISA foi avaliado como conveniente por serem seus resultados de fácil interpretação (KUO e SILVERMAN, 1980; WINDERMANN *et al.*, 1989; MATHIEU *et al.*, 1992; PEREIRA, 1996; ENTIS *et al.*, 2001).

Pereira *et al.* (1997), ao avaliarem métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas, concluíram que o RPLA e o ELISA (Ridascreen) foram considerados melhores em relação à especificidade para estrutura protéica das enterotoxinas. Os autores reportaram que as reações inespecíficas que ocorrem com o RPLA podem ser corrigidas com a adição de IgG Normal de soro de coelho, na concentração de 5%. O RPLA foi recomendado pelos autores para análise em grande número de amostras.

Park *et al.* (1996) avaliaram o kit RPLA e concluíram que sua sensibilidade em detectar enterotoxinas estafilocócicas é alta, 0,75 ng de enterotoxina por grama de alimento avaliado. No entanto, esta sensibilidade foi aumentada para 0,5 ng de enterotoxina por grama de alimento com o uso de IgG normal de soro de coelho a 0,5%.

De acordo com Park *et al.* (1994), a sensibilidade do método ELISA (Ridascreen) é menor que a técnica do *Reversed Passive Latex Agglutination* (SET-RPLA), detectando concentrações entre 0,3 e 0,35 ng.mL⁻¹ de enterotoxina no fluido sobrenadante obtido do crescimento microbiano em ágar de cultivo, confirmando assim a sua maior especificidade com relação ao reconhecimento das enterotoxinas.

Os métodos rápidos EIA/ELISA, TECRA-SE, ELISA (Ridascreen) e SET-RPLA para detecção de enterotoxinas estafilocócicas são recomendados como metodologia de referência pela APHA (ENTIS *et al.*, 2001).

Gomes e Gallo (1995) encontraram contagens de *S. aureus* em leite cru e queijo minas frescal, respectivamente, $1,2 \times 10^3$ a $7,4 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ e de $4,7 \times 10^4$ a $1,4 \times 10^6$ UFC.g⁻¹, representando uma população de risco na qual é iniciada a síntese de enterotoxina. Já para leite pasteurizado tipo C não foi detectada a presença do microrganismo. Nenhuma linhagem isolada foi produtora de enterotoxina pela técnica "OSP" (*Optimum Sensitivity Plate*), que não é efetiva para detecção de concentrações inferiores a 0,75 ng de enterotoxina, por grama de alimentos.

Nascimento *et al.* (1991) relataram um surto causado pela ingestão de leite em pó contaminado com enterotoxina estafilocócica tipo E, que ocorreu entre crianças de uma escola, destacando a importância da reconstituição como uma das causas de contaminação pelo *S. aureus*.

O queijo tipo coalho, um produto comumente encontrado na Região Nordeste, também produzido de forma artesanal, foi descrito como um alimento com qualidade microbiológica insatisfatória para consumo. A presença de *S. aureus* não foi evidenciada durante o armazenamento, provavelmente, devido à microbiota competitiva. Entretanto, foi constatada a necessidade de maior atenção no processamento do produto e na qualidade da matéria-prima (EUTHIER *et al.*, 1998).

2.2. Avaliação de ar de ambientes

O ar dos ambientes em uma indústria de alimentos pode constituir uma fonte de contaminação, dependendo das condições higiênicas desse ar e do tempo de exposição dos alimentos e das superfícies das indústrias. A qualidade microbiológica do ar do ambiente em uma planta da indústria de alimentos pode comprometer diretamente a segurança microbiológica dos alimentos, ou a manutenção da sua inocuidade. Produtos lácteos e de panificação são particularmente sensíveis à contaminação por microrganismos transportados por partículas suspensas no ar (EVANCHO *et al.*, 2001).

Os microrganismos podem estar presentes nos ambientes na forma de partículas, também denominadas de aerossóis ou bioaerossóis, que podem transportar células isoladas ou aglomerados de células em partículas sólidas e líquidas (SULLIVAN, 1979; NORTH CUTT *et al.*, 2004). Existem diversas possibilidades de formação de aerossóis nas áreas de processamento em indústria de processamento de ovos (NORTH CUTT *et al.*, 2004), indústria de processamento de carne suína e bovina (CUNDITH *et al.*, 2002; CHAPIN, *et al.*, 2005) e indústria de pescado (IVANOV *et al.*, 2004).

Os produtos alimentícios são expostos ao ar durante as etapas de manipulação, armazenamento, processamento e embalagem. Portanto, a possibilidade de o ar atuar como veículo de microrganismos deterioradores e,

ou, patogênicos deve ser considerada. *Staphylococcus* produtoras e pauciprodutoras de enterotoxinas, espécies resistentes à metilicina, representam um risco à indústria de alimentos quando aderidas em partículas suspensas no ar. Diversos autores relatam que espécies coagulase negativas são mais frequentes em ambientes de processamento, comparadas a *Staphylococcus aureus* (CHAPIN *et al.*, 2005).

Outros tipos de indústrias, hospitais, ambulatórios, lactários ou ainda os ambientes urbanos também estão sujeitos à contaminações veiculadas pelo ar, principalmente em função da exposição dos operadores a microrganismos patogênicos (MANCINELLI e SHULLS, 1978; SILVA *et al.*, 2003). A presença de *Campylobacter* spp. em indústrias de processamento de carnes foi reportada por Wilson (2004), evidenciando os riscos aos quais os manipuladores e os alimentos estão expostos.

Em indústrias de produtos lácteos, os aerossóis podem ser gerados pela a atividade dos funcionários durante a industrialização do leite e derivados, em drenos do piso, em sistemas de ventilação forçada ou por circulação de funcionários, de comunicação e circulação entre salas distintas, pelo derramamento de leite e de outros subprodutos, pelos sistemas de transporte e pela água usada sob pressão para higienização das superfícies e dos equipamentos, e mesmo quando usada para limpeza de paredes e pisos (HELDMAN 1974; KANG e FRANK, 1980).

De acordo com Heldman (1974), as superfícies sujeitas à adesão microbiana podem ser consideradas potenciais fontes de contaminação do ar do ambiente, fornecendo condições adequadas para formação de bioaerossóis.

Radmore *et al.* (1988) constataram alta correlação entre o número de microrganismos presentes no ar do ambiente da área de embalagem de leite e o número de microrganismos contaminantes no produto final. Os autores observaram que após 60 segundos de exposição do produto ao ar a contagem foi de $3,0 \times 10^2$ UFC.m⁻³ a $3,9 \times 10^3$ UFC.m⁻³ e que 1,5 % dos microrganismos presentes na amostragem de ar, por m³, era capaz de contaminar 1 litro de um determinado produto, em um recipiente com abertura de 100 cm², resultando na redução significativa da vida-de-prateleira.

Ren e Frank (1992) constataram em manipuladores um aumento na contagem total de aeróbios e *S. aureus*. Os principais contaminantes presentes

nos aerossóis incluíram células vegetativas, especialmente de estafilococos, estreptococos e micrococos, e outros microrganismos associados ao trato respiratório, aos cabelos e à pele.

Os drenos contribuem para aumentar a concentração de bioaerossóis, quando a água respinga ou forma bolhas. Ren e Frank (1992) observaram que o número de partículas viáveis detectadas na contagem de bactérias transportadas pelo ar reduziu proporcionalmente com a diminuição do número de vezes em que os drenos eram usados. Este resultado indica que as populações microbianas que crescem nos resíduos sólidos do interior dos drenos formam aerossóis em função do deslocamento do ar, por ação do fluxo de água.

O sistema de ventilação, presente na maioria das plantas de processamento de alimentos, também pode contribuir para a contaminação microbiana do ar. Para obtenção de um *design* ou manutenção adequada desse sistema, é necessário o conhecimento do fluxo de circulação do ar na indústria, como também da difusão das suas partículas (MANCINELLIT e SHULLS, 1978). Um sistema de ventilação eficiente pode, por outro lado, auxiliar na remoção de microrganismos do ambiente, contribuindo para o controle da qualidade microbiológica, da temperatura e da umidade relativa do ar do ambiente (SILVA et al., 2003).

A determinação da qualidade microbiológica do ar pode ser realizada por vários métodos, incluindo a técnica de sedimentação simples, impressão em superfície de ágar, empregando-se o amostrador de ar, filtração, centrifugação, precipitação eletrostática, colisão em líquido e precipitação térmica. Cada método possui suas vantagens e limitações. Assim, a seleção de um amostrador de ar e de um método adequado ao que se pretende é um ponto a ser considerado para o monitoramento da qualidade do ar. Os métodos de sedimentação e impressão em ágar são mais utilizados e permitem o uso de meios seletivos ou não para detecção e quantificação de microrganismos presentes nos bioaerossóis (EVANCHO *et al.*, 2001).

O método de sedimentação em placas é baseado na deposição de partículas transportadas pelo ar, na superfície de meio de cultura. É influenciado pela dimensão das partículas, contendo células viáveis. Aquelas partículas que apresentam dimensões de, aproximadamente, 10 µm

depositam-se mais facilmente do que as partículas menores. No entanto, dependendo da velocidade e direção das correntes de ar, a deposição das partículas menores pode ser facilitada. A 16ª edição de *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* agrupa os métodos de análises em classes O, A1 e A2 como metodologias-padrão: classe B para métodos testados, usados com eficácia em certas situações de pesquisas; classe C para métodos não-testados, mas reconhecidos por laboratórios como possíveis de serem utilizados, e classe D para métodos que eram classe O, A1 e A2, mas devido a tecnologias mais avançadas foram substituídos por um método classificado como superior. Não há um método classe A para testar a qualidade microbiológica do ar. O método de sedimentação simples é tido como classe D, recomendando-se 15 minutos de exposição para placas de Petri com 90 mm de diâmetro, contendo ágar ou meios seletivos (EVANCHO *et al.*, 2001).

Os amostradores de ar que fazem sucção, *sieve samplers*, consistem em imprimir certo volume de ar em ágar ou meio seletivo. Esses amostradores de ar podem ser de um ou múltiplos estágios, ou seja, contém uma ou uma série de placas de metal, com orifícios igualmente dispostos e sucessivamente menores (Figura 1). Esta série de placas permite que as partículas menores sejam coletadas nos estágios finais, devido ao aumento da velocidade do ar, fornecendo também a informação da distribuição das partículas, em função de suas dimensões (KANG e FRANK, 1980). Com um fluxo constante de 100 litros de ar por minuto, o MAS 100 Air Sampler-Merck é um amostrador que tem a capacidade de coletar e recuperar partículas viáveis acima de 1 μm (MERCCK®, 2001). Com base no princípio do amostrador de ar, o equipamento coleta e imprime o ar em uma superfície de meio de cultura, logo após este atravessar uma placa de metal com 400 poros, igualmente distribuídos, à velocidade de 0,45 m/segundo para aspiração horizontal. Compensando fatores como influência do fluxo de ar, volume de ágar e dimensão da placa, o amostrador fornece resultados corretos e precisos, sendo classificado pela 16ª edição de *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* como método classe B (Figura 1) (EVANCHO *et al.*, 2001).

A eficiência da avaliação microbiológica do ar varia de acordo com o amostrador utilizado e a natureza dos bioaerossóis a serem amostrados (HUYS *et al.*, 2005).



Figura 1 – Esquema e princípio de funcionamento de um amostrador de ar (A) e foto do equipamento Air sampler MAS – 100 (B) (Merck[®], 2005).

As recomendações para a qualidade microbiológica do ar podem ser estabelecidas de acordo com os grupos de microrganismos pesquisados por volume de ar ou pela deposição de partículas viáveis em área e tempo definidos, e pela concentração crítica de contaminantes para cada alimento em questão ou tipo de indústria de alimentos. As recomendações propostas pela *National Aeronautics and Space Administration* estão apresentadas na Tabela 1 e são adotadas pela APHA. Essas recomendações também podem ser usadas como referência para se estabelecer uma especificação própria para determinadas situações. Definindo três classes diferentes de limpeza, o padrão define procedimentos para avaliação com o uso de um amostrador *slit sampler*, que suga o ar em um meio líquido para crescimento dos microrganismos (EVANCHO *et al.*, 2001).

A partir de um estudo realizado em ambientes de embalagem de produtos lácteos, foi proposta uma outra recomendação para a qualidade microbiológica do ar de acordo com os números máximos de microrganismos em relação ao tempo de exposição do produto. Estes números máximos foram estabelecidos de forma a garantir que a contaminação resultante em 1 litro de produto não ocasione alterações indesejáveis. Os números são dados para equipamentos coletores de ar com áreas de coletas de diferentes dimensões de abertura e diferentes períodos de exposição de coleta de ar, ou pela técnica de sedimentação simples, conforme Tabela 1. As classes de limpeza indicam diferentes tipos de estabelecimentos. A classe A corresponde a indústrias de equipamentos médico-hospitalares, a B indica indústrias farmacêuticas e a C enquadra as indústrias de alimentos (RADMORE *et al.*, 1988).

Tabela 1 – Recomendação da *American Public Health Association* para o controle microbiológico ambiental, com base no número de partículas toleráveis em função da classe de limpeza

Coleta de Ar	Classes de Limpeza – Sistema Métrico Internacional		
	100	10.000	100.000
Número máximo de partículas viáveis/litro de ar – técnica de impressão em ágar	0,0035	0,0176	0,0884
Número médio de partículas viáveis/m ² /semana – técnica de sedimentação simples	12.900	64.600	323.000

Fonte: adaptado de Evancho *et al.* (2001).

Um programa de monitoramento da qualidade do ar pode ser aplicado em plantas de processamento de laticínios, com a finalidade de controlar a presença de patógenos e deterioradores, aumentando a vida-de-prateleira dos produtos. Um acréscimo de sete dias na vida-de-prateleira de leite pasteurizado foi obtido com o uso de um sistema asséptico de embalagem, que elimina o risco de contaminação por microrganismos transportados pelo ar (Tabela 2).

Tabela 2 – Números máximos aceitáveis de microrganismos por m³ de ar, em função do tempo de exposição e da dimensão da abertura do recipiente de embalagem

Abertura, cm ² , de Recipientes de Embalagens de Alimentos	Tempo de Exposição em Segundos da Embalagem ao Ar de Ambiente em uma Indústria de Alimentos							
	1	2	3	4	5	10	15	20
5	785	390	262	197	157	79	52	40
10	392	161	130	100	78	38	25	20
15	260	130	86	65	52	25	17	13
20	195	98	65	50	40	20	13	10
50	78	40	25	20	16	8	6	4
100	40	20	13	10	8	4	3	1

Fonte: Radmore *et al.* (1988).

As oportunidades de se prevenir a contaminação do ar são numerosas, mas a complexidade de cada situação impõe a necessidade de análises cuidadosas com a finalidade de estabelecer a mais eficiente técnica de controle. A análise dos vários fatores que contribuem para a ocorrência de contaminação por microrganismos transportados por partículas suspensas no ar e o grau dessa contaminação podem fornecer subsídios para o desenvolvimento de possíveis técnicas de controle ambiental (SALUSTIANO, *et al.*, 2003). Os autores sugerem a aplicação de sanificantes por pulverização, fazer o rodízio de agentes químicos e realizar avaliação dos procedimentos adotados.

Considerando a preocupação mundial com a qualidade do ar de ambientes, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), implementou a Portaria nº 3523/GM, de 28 de agosto de 1998, para determinação dos padrões de qualidade de ar de ambientes e o seu monitoramento. Entretanto, essa Portaria restringe-se a ambientes climatizados, enfatizando o controle do uso de equipamentos de ar condicionado. A Portaria nº 3.523, de 28 de agosto de 1998, e a Resolução RE/ANVISA nº 176, de 24 de outubro de 2000, que revogou a portaria anterior, determinam que o monitoramento desses padrões inclua como controle microbiológico somente de fungos (BRASIL, 2000; GAVA, 2002). Percebe-se, então, a preocupação do Ministério da Saúde com a qualidade do ar dos ambientes, no entanto ainda é necessária a inclusão de controle de ar nos estabelecimentos de processamento de alimentos, como indústria de alimentos, unidades de alimentação e nutrição, dentre outros.

2.3. Avaliação de superfícies de equipamentos utilizados na indústria de alimentos

Equipamentos e ambientes mal higienizados podem transferir aos alimentos sabores e odores estranhos, oriundos de resíduos acumulados. Nos alimentos sem tratamento térmico eficiente, a falta de higiene poderá levar a sérios problemas de doenças de origem alimentar.

A forma mais usual para comprovar as condições de higiene de superfícies de equipamentos e utensílios é o monitoramento da presença de

microrganismos, antes e, principalmente, após os procedimentos de higienização.

Técnicas de avaliação da eficiência da higienização se baseiam na remoção e recuperação, em meios de cultura apropriados, dos microrganismos sobreviventes das superfícies higienizadas. As técnicas de coleta através de *swabs*, placas de contato e rinsagem representam os testes mais utilizados (NISKANEN e KOIRANEM, 1977).

Para manipuladores, superfícies de equipamentos e utensílios, recomenda-se a técnica do *swab* ou rinsagem (EVANCHO *et al.*, 2001).

Equipamentos e utensílios mal higienizados têm sido associados a surtos de doenças de origem alimentar ou a alterações de alimentos de processamento de alimentos (SILVA, 1996). Alguns relatos correlacionam superfícies de utensílios e equipamentos contaminados como responsáveis por, aproximadamente, 16% dos surtos de toxinfecções alimentares (BANWART, 1989). Silva (1996) constatou que em cerca de 2.000 surtos de doenças de origem alimentar, ocorridos no período de 1961 a 1982, 100 surtos (5%) foram provocados exclusivamente pela higienização inadequada de equipamentos e utensílios em uma indústria de laticínio.

A contaminação em superfícies ocorre por meio do contato com manipuladores e superfícies contaminadas e também através da deposição de partículas de ar contendo microrganismos, originando uma contaminação cruzada. Assim, superfícies como as de polietileno, utilizado em placas para corte, cabos de utensílios cortantes e recipientes, podem constituir potencial veículo de contaminantes (SILVA, 1996).

Na Tabela 3 estão algumas recomendações microbiológicas de órgãos e entidades internacionais de referência e de alguns autores para contagem de grupos de microrganismos mesófilos aeróbios para ar de ambientes, superfícies de equipamentos e utensílios.

2.4. Avaliação de manipuladores de alimentos

Outra fonte de contaminação a ser considerada se refere ao contato direto dos alimentos com os manipuladores ou funcionários presentes na linha

Tabela 3 – Recomendações microbiológicas para mesófilos aeróbios em ambientes, equipamentos e utensílios, propostas por alguns pesquisadores

Entidade/Pesquisador	Classificação	Ambiente*	Equipamentos/ Utensílios**
APHA (2001)		30	02
OPAS ¹	Excelente	-	De 0 a 10
	Bom	-	De 11 a 29
	Regular	-	De 30 a 49
	Ruim	-	De 50 a 99
	Péssimo	-	Maior que 100
Almeida (1994)		100	
Silva Jr. (1993) ¹	Satisfatório	-	50
	Insatisfatório	-	Maior que 50
Harrigam e MacCance ¹	Satisfatório	-	Menor ou igual a 5
	Insatisfatório	-	Maior que 5
Tiedman ¹	Satisfatório	-	Até 100
	Insatisfatório	-	Maior que 100

Fonte: adaptado de Silva (1996).

- Não-sugerido

* UFC.cm⁻².semana⁻¹.

** UFC.cm⁻².

de processamento dos alimentos. Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005), os manipuladores representam as principais fontes de contaminação, visto que sua participação, isoladamente ou associada a outras fontes de contaminação, chega a atingir até 26% dos surtos. Estima-se ainda que aproximadamente 2,1 milhões de pessoas apresentaram quadros de doenças alimentares em 2000, nos Estados Unidos. Nesse estudo, observou-se que ocorreram 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes no mesmo ano. A relação existente entre manipuladores de alimentos e doenças bacterianas de origem alimentar pode ser a responsável pela contaminação dos alimentos, principalmente através de manipuladores doentes, portadores assintomáticos, os que apresentam hábitos de higiene pessoal inadequado, ou ainda os que usam métodos higiênicos inadequados, na preparação de alimentos (SMITH *et al.*, 2000).

Os manipuladores de alimentos têm um importante papel na prevenção das doenças alimentares. A preocupação maior é com relação à passagem dos microrganismos dos manipuladores para os alimentos, a partir das vias aéreas superiores, como nariz, garganta e faringe, da pele, das mãos e de lesões, como feridas. Mais importante ainda é a recontaminação dos alimentos já preparados pelos alimentos crus, tendo as mãos como fonte importante, além de superfícies, utensílios e uniformes (CARMO *et al.*, 2003).

A microbiota das mãos pode ser classificada como transiente ou residente. A microbiota residente geralmente consiste de estafilococos, que aderem à superfície da pele e persistem nos folículos capilares, nos poros, nas cavidades e nas lesões causadas por rachaduras na pele, não podendo ser facilmente removidos (ALMEIDA *et al.*, 1995).

É impossível “esterilizar” as mãos, sendo a desinfecção pelo calor impraticável, por isso a desinfecção química é uma alternativa. Muitas bactérias transitórias adquiridas dos alimentos crus, dos dejetos e do ambiente podem ser removidas das mãos através da lavagem correta com sabão e água em abundância, seguida do uso de um sanitizante apropriado. Apenas a lavagem não é suficiente para a eliminação de células de estafilococos, por mais que as mãos sejam cuidadosamente lavadas. A água de lavagem das mãos deve ser preferencialmente morna, para maior eficiência. As unhas devem ser curtas e minuciosamente limpas, usando escovas para auxiliar na limpeza. As escovas devem ser de material que permita sua limpeza através do uso de calor e também por soluções químicas. Bactérias intestinais, da pele ou das fossas nasais, causadoras de doenças alimentares, já foram isoladas de *swabs* esfregados sob as unhas (CARMO *et al.*, 2003).

O uso de luvas de borracha, látex ou silicone é questionável, pois elas não necessariamente ajudam a melhorar as condições bacteriológicas dos alimentos, principalmente pelo fato de que o uso de luvas pode levar os manipuladores a negligenciar a lavagem correta das mãos. Estudos comprovam que a higienização adequada das mãos é mais eficiente do que o uso de luvas (CARMO *et al.*, 2003).

Manipuladores de alimentos com lesões sépticas na pele devem ser excluídos da linha de processamento direto com os alimentos, até que sejam satisfatoriamente tratados. Exames médicos são requeridos na admissão de

um funcionário, para garantir o atestado negativo de doenças como tuberculose, patógenos intestinais e infecções cutâneas. Exames de fezes de manipuladores devem ser periodicamente solicitados, normalmente em intervalos de seis meses (BRASIL, 1997). Doenças, ainda que menos severas, devem ser notificadas imediatamente ao departamento médico de grandes estabelecimentos, ou à pessoa responsável em pequenos locais.

Durante e após um surto de doença de origem alimentar é necessário determinar a origem do agente etiológico. *Swabs* dos manipuladores e posterior análise de laboratórios podem indicar a presença de enterotoxina estafilocócica proveniente do nariz e da pele, bem como a necessidade de medidas de controle para evitar outros surtos.

2.5. Identificação de *Staphylococcus* spp.

De acordo com o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (HOLT *et al.*, 1994; MARTIN *et al.*, 2001), 32 espécies fazem parte do gênero do *Staphylococcus*.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos gram-positivos, pertencentes à família *Micrococcaceae*. São anaeróbios facultativos, mas apresentam maior crescimento sob condições aeróbias, quando, então, produzem a enzima catalase, utilizada como parte em sua identificação. Essas bactérias se dividem em planos diferentes, portanto, quando vistas ao microscópio, apresentam forma de cacho de uva (BAIRD-PARKER, 1990). Podem crescer em uma faixa de pH de 4,2 a 9,3, com pH ótimo de 7,0 a 7,5. A sua temperatura de crescimento situa-se entre 6,5 e 45 °C, com maior crescimento entre 30 e 37 °C, devendo ser ressaltado que a temperatura para produção da enterotoxina encontra-se na faixa de 37 a 40 °C (IGARASHI *et al.*, 1996).

A SE enterotoxina estafilocócica (SE) é termorresistente, não sendo destruída à temperatura normal usada para cocção de alimentos, pasteurização e outros tratamentos térmicos correntes (IGARASHI *et al.*, 1996).

As bactérias desse gênero são tolerantes a concentrações de 10 a 20% de NaCl e a nitratos, o que torna os alimentos curados veículos potenciais para

enterotoxinas. Geralmente, os estafilococos apresentam crescimento em atividade de água (aw) igual ou acima de 0,86, e em condições favoráveis podem crescer em aw de 0,83 (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

A presença de *S. aureus* em alimentos representa um risco para a saúde pública, devido à capacidade deste microrganismo produzir enterotoxinas e causar surtos de intoxicação alimentar (BRABES, 1999). A determinação dessa espécie bacteriana em alimentos é importante para avaliar as condições de elaboração, processamento e conservação, visando prevenir surtos de intoxicação estafilocócica (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

A presença de *S. aureus* no alimento é, geralmente, indicativa de contaminação a partir da pele, boca e das fossas nasais dos manipuladores de alimentos, bem como de limpeza e de sanitização inadequada dos materiais e equipamentos. Os alimentos mais propícios à contaminação por *S. aureus* são as carnes, os ovos, o leite, o pescado, as massas alimentícias, os cremes, a maionese e os doces de confeitaria (CARMO *et al.*, 2003).

Existem vários meios seletivos para o isolamento de *S. aureus* em alimentos. Desses podem-se citar o ágar Vogel-Johnson, em que as colônias de estafilococos apresentam-se pequenas e com halo amarelo devido à produção de ácido a partir do manitol; e o ágar Chapman, no qual as colônias típicas de *S. aureus* são identificadas pela degradação do manitol, produção de gelatinase e formação de pigmento amarelo-dourado. A reação característica de degradação do manitol é verificada pela viragem do indicador azul de bromotimol a amarelo, após a adição de gotas desta solução sobre as colônias. A produção de gelatinase é verificada pelo desenvolvimento de uma zona clara ao redor das colônias, cerca de 10 minutos, após a adição de gotas de solução saturada de sulfato de amônia sobre as colônias, ou de uma solução a 20% de ácido sulfossalicílico (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Um meio amplamente utilizado para o isolamento de *S. aureus* em alimentos é o ágar Baird-Parker, recomendado pela *Food Drug Administration* (FDA) (BANWART, 1989). Esse meio contém, dentre outros componentes, piruvato de sódio, cloreto de lítio hexaidratado, glicina e telurito de potássio a 1%, acrescido de emulsão de gema de ovo a 50% em água salina esterilizada. Nesse meio, as colônias típicas de estafilococos apresentam-se negras, lustrosas, convexas, com tamanho de 1 a 5 mm de diâmetro, rodeadas por halo

claro de 2 a 5 mm de largura. A formação de colônias negras circundadas é devido à redução do telurito a telúrio e à lipólise e proteólise da gema, respectivamente. Esse meio é o mais indicado para recuperação de estafilococos, pois apresentam maior taxa de crescimento (ENTIS *et al.*, 2001).

Como os estafilococos encontram-se amplamente disseminados na natureza, torna-se impossível a sua eliminação do ambiente. A manipulação do alimento pelo homem, sem dúvida, leva à contaminação por estafilococos. O aquecimento do alimento logo após a sua manipulação destrói as células vegetativas dos estafilococos, ajudando na prevenção da intoxicação. Quando da impossibilidade dessas medidas, deve-se tomar cuidados especiais para evitar a contaminação durante a manipulação dos alimentos.

Acredita-se ser necessário, em torno de 10^5 UFC e 10^6 UFC de *S. aureus* por grama de alimento para que a toxina seja formada em níveis capazes de causar intoxicação. Como, normalmente, a bactéria encontra-se presente em números baixos, é preciso que ocorra a sua multiplicação, e ao controlar fatores que afetam esse crescimento, conseqüentemente, a produção de enterotoxina também estará sendo controlada e, em contrapartida, os próprios surtos. Não existe uma concordância entre os pesquisadores sobre a quantidade mínima de enterotoxina necessária para causar sintomatologia em seres humanos, devido a vários fatores. Em geral, essa quantidade é estimada entre 0,015 e 0,0375 µg de enterotoxina por quilograma de peso corpóreo, devendo ser lembrado que características individuais também devem ser levadas em consideração (PEREIRA, 1996).

Outro ponto a ser observado é quanto à inibição do crescimento do *S. aureus* por outros microrganismos. Cepas de *Lactococcus lactis lactis* e *Lactococcus lactis cremoris* competem com *S. aureus*, ajudando no controle de seu crescimento e de possíveis intoxicações (PARK *et al.*, 1993).

2.6. Surtos de doenças transmitidas por alimentos

De acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* dos Estados Unidos, define-se como surto de doença alimentar a ocorrência de dois ou mais casos de doença associada a um único alimento. A elucidação de

um surto de doença alimentar é realizada através de um “inquérito” epidemiológico, nos indivíduos que tenham e que não tenham consumido o(s) alimento(s) suspeito(s) e que tenham apresentado os sintomas ou não, bem como por exames laboratoriais, em amostras clínicas e amostras de alimentos. Deve-se considerar também que nem todos os indivíduos que consomem o mesmo alimento, contendo um agente patogênico, apresentam a mesma sintomatologia. O período de incubação, a gravidade e a duração da doença podem ser diferentes, em função da idade, do estado nutricional, da sensibilidade individual e da quantidade de alimento ingerido.

O sintoma mais comum nas doenças de origem alimentar é a diarreia. Dependendo do microrganismo envolvido no processo e das condições gerais do indivíduo afetado, a doença pode ser aguda, neste caso normalmente autolimitada, como também pode se tornar crônica e oferecer um maior risco. Por outro lado, as doenças de origem alimentar podem não se limitar ao trato gastrointestinal, mas afetar outros órgãos, podendo causar distúrbios no sistema nervoso, na corrente circulatória, no aparelho genital, no fígado, dentre outros (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Para o estudo da avaliação de surtos de doenças alimentares, primeiramente torna-se necessário esclarecer que nem todos os alimentos que contêm microrganismos patogênicos ou seus produtos metabólicos tóxicos são passíveis de provocar a doença quando consumidos. Isso somente ocorrerá se os mecanismos naturais de defesa do organismo forem incapazes de protegê-lo. Dentre esses mecanismos destaca-se a acidez estomacal, que, associada à ação das enzimas digestivas, constitui a primeira barreira natural a ser transposta pelos microrganismos patogênicos, podendo provocar inativação total ou parcial dos agentes etiológicos (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

2.7. Produção de enterotoxinas estafilocócicas

As EE são proteínas simples, ricas em lisina, tirosina, ácido aspártico e glutâmico, constituídas por duas moléculas de cisteína, formando uma ponte dissulfeto. Além disso, possuem peso molecular entre 26.000 e 29.000 daltons (BERGDOLL e REISER, 1980; ARBUTHNOTT *et al.*, 1990; SU e WONG, 1995).

As enterotoxinas, quando na forma ativa, apresentam resistência à ação de enzimas proteolíticas, como tripsina, renina, papaína, pepsina e quimotripsina (MINOR e MARTH, 1976; VARADARAJ e RANGANATHAN, 1989).

Atualmente são descritos sete tipos e três subtipos sorologicamente distintos de enterotoxinas: enterotoxina estafilocócica A (EEA), enterotoxina estafilocócica B (EEB), enterotoxina estafilocócica C (EEC, subtipos C₁, C₂ e C₃), enterotoxina estafilocócica D (EED), enterotoxina estafilocócica E (EEE), enterotoxina estafilocócica G (EEG) e enterotoxina estafilocócica H (EEH). Algumas enterotoxinas apresentam semelhança em sua seqüência de aminoácidos, como EEA e EEE, EEB e EEC. A EED é um pouco diferente das demais, apresentando maior similaridade com o grupo EEA e EEE (BERGDOLL e REISER, 1980; SU e WONG, 1995; PEREIRA, 1996; MARTIN *et al.*, 2001).

As enterotoxinas A e D são as que mais aparecem envolvidas em surtos de doenças, podendo estar isoladas ou em combinação (Bennett, 1986, citado por VARNAM e EVANS, 1991; MARTIN *et al.*, 2001). Segundo o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (HOLT *et al.*, 1994), a maioria das espécies produz EEA.

Omori e Kato (1959) relataram o primeiro surto de intoxicação alimentar provocado por estafilococos coagulase negativos em uma escola secundária em Osaka, no Japão, com pratos utilizados no lanche em uma visita a um hotel, envolvendo 40 estudantes. Outro surto notificado por Breckinridge e Bergdoll (1971) atingiu 264 pessoas que participaram de um banquete ocorrido em 1969, nos Estados Unidos, onde foi detectada a produção de enterotoxina estafilocócica tipo A (EEA) por estafilococos coagulase negativos, sendo a espécie *S. epidermidis*.

Em 1986, Crass e Bergdoll descreveram a produção de enterotoxinas EEA e EEC por estafilococos procedentes de pacientes com quadro de síndrome de choque tóxico e infecção estafilocócica e dos alimentos implicados no surto.

Além das enterotoxinas, as cepas de *S. aureus* produzem várias outras toxinas, como a α -toxina, a γ -toxina, a estafiloquinase, a toxina do choque tóxico, dentre outras. No entanto, apenas as enterotoxinas têm interesse em

alimentos. Atualmente, essa denominação para as enterotoxinas não é considerada a mais adequada, uma vez que os sintomas da intoxicação parecem estar mais relacionados ao estímulo imunológico do que ao desequilíbrio eletrolítico da mucosa (PARK *et al.*, 1993).

Na verdade, as enterotoxinas estafilocócicas apresentam várias ações, sendo a emética a reação mais freqüentemente observada nesse tipo de intoxicação. Os sítios dessa ação parecem localizar-se no intestino. Esse estímulo é transferido através dos nervos vago e simpático ao centro do vômito, que faz parte do sistema nervoso central (SNC). O centro do vômito induz à retroperistalsia do estômago e do intestino delgado, provocando o vômito. Por esta razão, as enterotoxinas deveriam ser denominadas neurotoxinas, e não enterotoxina. A ação diarréica é o segundo sintoma mais comum na intoxicação alimentar estafilocócica. O mecanismo de ação ainda não está perfeitamente elucidado, sendo aparentemente diferente de outras diarréias, como as provocadas por *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus*. Nestes dois casos, as toxinas provocam uma dilatação na alça do intestino de coelhos, enquanto as SE não o fazem. Uma provável explicação é a ativação de um mecanismo secretor de Na e Cl. Além disso, caso uma quantidade suficiente de enterotoxina esteja presente no alimento, ela causará inflamação e irritação da mucosa do estômago e intestino delgado. A ação de enterite não é facilmente observada, e a ação de estímulo das células T ainda não foi comprovada. As SE teriam a capacidade de estimular a proliferação das células T do sistema imunológico, o que levaria a considerá-las como superantígenos. Quando essas toxinas alcançam a corrente sangüínea devido a seus efeitos sobre os macrófagos e as células T, elas desencadeiam a produção e a liberação de citoquinas, e sua circulação na corrente sangüínea origina uma variedade de sintomas, entre eles náuseas, vômitos, mal-estar generalizado e febre (BERGDOL e REISER, 1980).

Os métodos existentes para detecção de enterotoxinas estafilocócicas são classificados em biológico e imunológico, sendo este último de maior aplicação. O método biológico consiste na administração intraperitonal ou intravenosa da enterotoxina em gatos jovens e via oral em macacos do gênero *Rhesus*, que são tidos como modelos animais confiáveis, apesar de ocorrerem algumas reações não-específicas. Devido à necessidade de altas doses de

enterotoxinas e às dificuldades de manutenção dos animais destinados para os testes, este método tornou-se praticamente inviável, passando-se então a usar os métodos imunológicos. Estes são ensaios com base no princípio de aglutinação da reação antígeno-anticorpo. Foram estudados e aperfeiçoados vários métodos imunológicos, dentre os quais podem ser relacionados os de reações em gel, em que se destacam as técnicas *Optimum Sensitivity Plate* (OSP) e *microslide* (VARADARAJ e RANGANATHAN, 1989).

A técnica OSP tem sensibilidade de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (ROBBINS *et al.*, 1974) e baseia-se no princípio de imunodifusão em gel, sendo adequada para análise de enterotoxigenicidade da maioria das linhagens de *Staphylococcus* spp. A técnica consiste em uma modificação do método de Ouchterlony, aliada à produção de enterotoxina pelos métodos do celofane sobre ágar ou cultura em saco de diálise tipo “bolsa” (DONNELLEY *et al.*, 1968; ROBBINS *et al.*, 1974).

Pela técnica de ‘microslide’ podem ser detectadas diretamente no alimento quantidades de enterotoxinas inferiores a $0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (VARADARAJ e RANGANATHAN, 1989), necessitando-se de 100 g do alimento com concentração do extrato para 0,2 mL de sobrenadante extraído do crescimento de cinco dias de incubação (OLIVEIRA e HIROOKA, 1996). Essa técnica tornou-se inviável pelo tempo requerido para análise, que é de cinco dias e pela detecção de somente concentrações altas de enterotoxinas.

Outros métodos como o SET-RPLA, ELISA-Ridascreen e TECRA-SE foram estudados e aperfeiçoados com o objetivo de detectar quantidades menores de enterotoxinas presentes nos alimentos. Quantidades menores que 20 ng de EEA foram relatadas como suficientes para causar intoxicação, demonstrando a necessidade de ensaios imunológicos que têm maior sensibilidade de detecção de 1 a 2 ng.g^{-1} de enterotoxinas (OLIVEIRA e HIROOKA, 1996).

Atualmente, os ensaios *Reverse Passive Látex Agglutination* (RPLA) e *Enzyme-linked Immunisorbent Assay* (ELISA) têm proporcionado melhores resultados, sendo baseados no uso de anticorpos específicos. O método Aglutinação de Látex Passiva Reversa (SET-RPLA) é um teste de aglutinação que utiliza anticorpos purificados em cromatografia de afinidade recobertos por partículas de látex. De acordo com Igarashi *et al.* (1986), sua sensibilidade é de 0,5 ng de enterotoxina por grama de alimento. Esse teste é bastante utilizado,

por ser de fácil manuseio e o kit estar disponível comercialmente. Ele é semiquantitativo e as partículas de látex são dotadas de alta densidade, permitindo um tempo de realização de análise de até 4 horas, não necessitando de equipamentos para leitura e interpretação dos resultados. Sua limitação está na ocorrência de reações inespecíficas, que se apresentam como uma mancha branca, interferindo na sensibilidade das partículas de látex e das partículas controle. Uma alternativa para minimizar a ocorrência de reações inespecíficas é a utilização de 5% de IgG (imunoglobulina G) normal e purificada para tratamento das amostras (PEREIRA *et al.*, 1996).

Outro método para detecção de enterotoxinas estafilocócicas é o (TECRA-SE[®]). Park *et al.* (1992; 1993; 1996), avaliando a eficiência desse método com relação a reações inespecíficas ocorridas no SET-RPLA, concluíram que estas podem ser devido a contaminações por outros microrganismos, como *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*. Com relação aos extratos de enterotoxinas extraídos do crescimento dos microrganismos, os autores também propõem tratar com IgG normal de soro de coelho, submeter o substrato ao tratamento térmico de 70 °C, por 3 minutos e realizar simultaneamente testes com outros kits, como o SET-RPLA e o ELISA-Ridascreen[®].

O ELISA-Ridascreen[®] é um método imunoenzimático dos mais sensíveis e rápidos e que foi modificado para eliminar a interferência com a proteína A. Este método tem a sensibilidade de 10 ng.mL⁻¹ de toxina e o teste é completado em 8 horas, incluindo o tempo de extração. A vantagem deste método também é a detecção da toxina EEE, não identificada por outros métodos (PARK *et al.*, 1993).

Oliveira e Hirooka (1996), avaliando kits comerciais, recomendaram testes mais sensíveis para detecção de enterotoxinas, principalmente em linhagens produtoras de concentrações não-detectáveis por métodos de difusão, mas que são passíveis de causar intoxicação mesmo em baixas concentrações. Os autores recomendam ainda o uso do RPLA quando se quer avaliar um número elevado de cepas, devido à sua praticidade, e do ELISA (Ridascreen[®]), em situações de ocorrências de reações inespecíficas, conforme detectadas pelo teste SET-RPLA. As reações inespecíficas

eventualmente ocorrem quando as estirpes, geralmente das espécies coagulase negativas, produzem pequenas quantidades de enterotoxinas não-detectáveis pelo SET-RPLA.

2.8. Adesão microbiana e formação de biofilme

As pesquisas sobre adesão bacteriana tiveram início há algumas décadas, quando se observou que os microrganismos aderidos ou em biofilmes eram responsáveis por processos corrosivos em superfícies imersas em sistemas marinhos aquáticos (ZOBELL e ALLEN, 1935; ZOBELL, 1943; COSTERTON *et al.*, 1978; CHARACKLIS e COOKSEY, 1983; FLETCHER, 1987).

A adesão microbiana e a formação de biofilmes ocorrem em virtude da deposição de microrganismos em uma superfície de contato, onde se fixam e iniciam o seu crescimento (ZOTTOLA, 1994; 1997).

Os biofilmes são constituídos por bactérias aderidas a superfícies e envolvidas por uma camada de partículas de matéria orgânica, formando depósitos onde os microrganismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza protéica ou polissacarídeos, conhecidos por glicocálix ou exopolissacarídeo (CRIADO *et al.*, 1994). Esses biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais, vitaminas, entre outros, formando uma espécie de crosta, debaixo das quais os microrganismos continuam a crescer, caracterizando um cultivo “puro” ou uma associação com outros microrganismos. Quando em biofilmes, os microrganismos apresentam maior resistência à ação de agentes químicos e físicos, comumente usados em procedimentos de higienização (MOSTELER e BISHOP, 1993).

Os biofilmes causam problemas na indústria de alimentos (ZOTTOLA 1994). Podem ocorrer riscos à saúde pública e redução o prazo de validade dos produtos desde o processamento até a comercialização, o que traz prejuízo econômico às indústrias. Além disso, eles podem até mesmo diminuir a transferência de calor em trocadores, reduzir o fluxo em tubulações e desencadear processos corrosivos dos equipamentos e dos utensílios empregados pela indústria. Dessa forma, torna-se importante à associação de

procedimentos de higienização na prevenção da formação de biofilmes (MAFU *et al.*, 1990; SPURLOCK e ZOTTOLA, 1991; ABRISHAMI *et al.*, 1994; KIM e FRANCK, 1994; RESTAINO *et al.*, 1994a e 1994b).

As atividades dos biofilmes podem ser descritas em termos de propriedades físico-químicas das superfícies, associando o metabolismo bioquímico do microrganismo e o desenvolvimento de ambos na matriz do biofilme (MITTELMAN 1998).

A formação de biofilmes, por outro lado, pode ser desejável para a indústria de alimentos. É desejável, por exemplo, na obtenção de produtos fermentados, como o vinagre, a aguardente, o vinho e o polvilho, onde as bactérias crescem em biofilmes sobre camadas finas dos tonéis de madeira ou concreto e convertem o substrato em produto final. Outro uso para os biofilmes é no tratamento de águas residuais oriundas do processamento de alimentos (TAKAZAKI *et al.*, 1992).

Microrganismos podem estar aderidos em diversas superfícies da indústria de alimentos que contenham resíduos de compostos orgânicos, que sirvam como fonte de alimento. Na adesão também acontece interferência de forças físicas, como Força de Van der Waals e atração eletrostática. Dentre as superfícies relacionadas à indústria de alimentos nas quais podem ocorrer adesão microbiana e possível formação de biofilme, destacam-se o aço inoxidável AISI 304 #4, a borracha, o vidro, o polietileno e o polipropileno (ZOTTOLA, 1994; 1997).

A eficiência dos procedimentos de limpeza e de sanitização de equipamentos e utensílios tem grande importância para as indústrias de alimentos, para prevenir e controlar a formação dos biofilmes. A eficiência dos sanitizantes sobre as superfícies com biofilmes é reduzida em virtude da reação entre os detergentes e sanitizantes e os resíduos de proteínas, gorduras, carboidratos, minerais e outras substâncias produzidas pelos microrganismos (MOSTELLER e BISHOP, 1993).

Vários fatores podem influenciar o processo de adesão às superfícies, como as características do microrganismo, do material aderente e do meio que envolve os microrganismos (TROLLER, 1993), deste modo as espécies e a concentração em que elas se apresentam podem afetar o processo. De acordo com Mosteller e Bishop (1993), bactérias gram-negativas, por exemplo,

aderem-se mais facilmente às superfícies. Outros fatores importantes no processo de adesão são os tipos, a forma iônica e o tamanho da partícula do material de aderência (ZOTTOLA, 1997).

Muitas bactérias, no seu habitat natural, podem existir em duas formas diferentes: a) no estado planctônico, em que se apresentam de forma livre, e b) no estado sésil, em que estão aderidas a uma superfície (MASRHALL, 1992). Estima-se que 99% de todas as bactérias em ambientes naturais estão sob a forma de biofilmes, ou pelo menos residem em uma superfície (VICKERS, 1986).

Outra definição estabelece que o biofilme é a agregação de células microbianas que crescem e multiplicam-se em uma superfície, sendo essa agregação promovida por substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelos próprios microrganismos (FLINT *et al.*, 1996).

As pesquisas sobre adesão bacteriana tiveram início há algumas décadas, quando se observou que os microrganismos aderidos ou em biofilmes eram responsáveis por processos corrosivos em superfícies imersas em sistemas marinhos aquáticos (ZOBELL e ALLEN, 1935; ZOBELL, 1943; COSTERTON *et al.*, 1978; CHARACKLIS e COOKSEY, 1983; FLETCHER, 1987).

Existem diversas teorias que tentam explicar a formação de um biofilme. Marshall (1992) e Mosteller e Bishop (1993) descreveram que a adesão em superfícies sólidas é um processo que acontece em duas etapas. A primeira, considerada reversível, ocorre com o microrganismo fracamente aderido à superfície por meio de forças Van der Waals e atração eletrostática, facilitando sua remoção. Já a segunda etapa é considerada irreversível, dependendo do tempo de aderência, pois envolve a adesão física da célula à superfície por meio do material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica produzida pelo microrganismo, conhecido por glicocálix e que atua como suporte à formação do biofilme.

O glicocálix é uma substância produzida somente após a adesão superficial, fornecendo, assim, condições ideais para a adesão do peptídeoglicano das bactérias gram-positivas e da parte externa da membrana externa das bactérias gram-negativas (MOSTELLER e BISHOP, 1993).

Uma segunda teoria propõe a formação do biofilme como um processo que ocorre em etapas diferenciadas, seguindo esta ordem: transporte de nutrientes e matéria orgânica e inorgânica para a superfície sólida, formação de uma camada de nutrientes orgânicos e inorgânicos, adesão dos microrganismos à superfície seguida de crescimento celular, e intensa atividade metabólica no biofilme que numa última etapa caracteriza-se por uma espécie de “crosta”. Essa teoria foi descrita por Characklis e Cooksey (1983) e Characklis (1996).

Outra teoria propõe que a adesão se divide em três etapas: fixação da bactéria à superfície, consolidação da bactéria à superfície e crescimento da bactéria na superfície. Nessa teoria, a consolidação é considerada um estágio importante, pois os microrganismos que produzem material extracelular propiciam a fixação das células nas superfícies, e neste ponto as células fixadas não são removidas pelo processo de rinsagem (ZOTTOLA, 1994; 1997).

Durante o estágio de colonização, algumas mudanças podem ocorrer entre a microcolônia e a superfície de adesão. O complexo polissacarídico presente no glicocálix pode se ligar a íons metálicos, alterando a natureza química e física do biofilme, devendo ser ressaltado que os subprodutos metabólicos, desses microrganismos, como ácidos, podem ser encontrados, resultando em corrosão do local (SCHWACH e ZOTTOLA, 1982).

O contato direto entre a bactéria e o substrato pode ser estabelecido em nível molecular por meio de substâncias poliméricas extracelulares, produzidas pelas bactérias. Essas substâncias não estão sujeitas ao mesmo tipo de repulsão que as bactérias, portanto podem facilitar a adesão entre a bactéria e a superfície por várias combinações de ligações químicas (eletrostáticas, covalente e de hidrogênio), interações dipolo (dipolo-dipolo, dipolo-induzido dipolo e íon-dipolo), além de interações hidrofóbicas. Conseqüentemente, a bactéria pode vir a ter diferentes tipos de adesividade (MARSHALL, 1992). As substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelos microrganismos desenvolvem o importante papel de proteger a célula da desidratação, já que podem reter água em quantidade várias vezes maior que a sua massa e se desidratam lentamente (SCHWACH e ZOTTOLA, 1982).

A presença de cápsula pode aumentar a adesão microbiana e atuar também como defesa contra processos de fagocitose, podendo afetar a adsorção de agentes tóxicos, prevenindo a penetração no citoplasma bacteriano. A cápsula de muitas bactérias é composta por polissacarídeos, embora algumas espécies possam formar cápsula de polipeptídeos. Essas estruturas também podem conferir proteção aos microrganismos quando em biofilmes (SCHWACH e ZOTTOLA, 1982).

Após o contato inicial com a superfície, os microrganismos iniciam a síntese de fibras, que podem ser observadas por microscopia eletrônica. Essas fibras tornam-se mais espessas com o decorrer do tempo, levando também à formação da matriz do biofilme, dentro da qual outras substâncias orgânicas, inorgânicas e materiais particulados podem existir juntamente com os microrganismos. A produção de exopolissacarídeo permite o aumento da adesão da bactéria à superfície. Caso as células do biofilme sejam reinoculadas em meio de cultura como células planctônicas, haverá redução na produção do exopolissacarídeo (SCHWACH e ZOTTOLA, 1982).

As técnicas microscópicas são as mais recomendadas para visualização da adesão bacteriana, crescimento e formação de biofilmes em sistemas de processamento, podendo até acompanhar o desenvolvimento do biofilme em tempo real. Dentre os vários tipos de microscopia utilizados, podem ser citadas a microscopia ótica, a de epifluorescência, a de contraste de fase e a eletrônica de varredura e de transmissão. A escolha do tipo de microscopia a ser utilizada dependerá do aspecto de formação do biofilme que se deseja analisar (EVANCHO *et al.*, 2001).

A microscopia ótica foi utilizada por Zobbel (1935), o primeiro pesquisador a reconhecer o papel da adesão bacteriana na formação de depósitos e corrosão de superfícies sólidas submersas no mar. Essa constatação foi possível graças à capacidade que os microrganismos têm de se aderirem a lâminas de vidro, que posteriormente foram coradas e observadas ao microscópio ótico. Esta técnica apresenta limitações, dentre elas a baixa resolução e a necessidade do uso de superfícies transparentes, como o vidro (ZOTTOLA, 1994).

A microscopia de contraste de fase também é muito útil nos estudos de adesão microbiana em superfícies. É particularmente recomendada quando se

deseja acompanhar o desenvolvimento da formação do biofilme em tempo real, também em uma superfície transparente (EVANCHO *et al.*, 2001).

A técnica de microscopia de epifluorescência é uma alternativa excelente na quantificação das células aderidas às superfícies, que podem ser transparentes ou não. Para melhor visualização da adesão bacteriana, recomenda-se o uso de substâncias fluorescentes como o alaranjado de acridina para a coloração direta das células, ou ainda o uso de anticorpos fluorescentes que se ligam às células, permitindo, assim, a sua observação pela microscopia. Um fator significativo para o melhor aproveitamento operacional desse tipo de microscopia é a existência de uma boa correlação quando comparada à técnica de contagem total em placas. O uso do corante alaranjado de acridina para colorir as células microbianas, associado ao microscópio de epifluorescência, promove uma coloração diferencial, em que as bactérias que fluorescem de cor alaranjada são consideradas células viáveis, devido à predominância do ácido ribonucléico (RNA), e as que fluorescem verde são as inviáveis, onde predomina o ácido desoxirribonucléico (DNA), diferenciando o seu estágio de desenvolvimento metabólico. Algumas colorações intermediárias podem ocorrer, mas somente as células fluorescendo nas cores laranja ou laranja-avermelhada são consideradas na contagem (PARIZZI *et al.*, 2004). A microscopia de epifluorescência pode ser melhorada pelo uso de uma unidade de varredura confocal, pois permite o exame de imagens em vários planos, podendo também ser reconstituídas para uma observação tridimensional da amostra (PARIZZI *et al.*, 2004).

Já as técnicas de microscopia eletrônica são as mais indicadas quando se deseja analisar a interação microbiana na matriz do biofilme. De modo geral, as amostras são fixadas por meio de agentes químicos, como o glutaraldeído, o paraformaldeído e o ósmio, ou criofixadas, onde a amostra é rapidamente congelada, para evitar os danos às células pelos cristais de gelo (ZOTTOLA, 1997). Dentre as técnicas de microscopia eletrônica incluem-se a de varredura (MEV) e a de transmissão (MET). Uma seqüência típica de preparação da amostra a ser analisada pela MEV consiste no desenvolvimento de biofilme sobre um “suporte” sólido, por exemplo, o vidro, o aço inoxidável AISI 304 #4 e a borracha, seguido pela fixação da amostra, dessecação e cobertura com metal. Essas etapas influem na qualidade da imagem resultante. Para análises

por MET, após desidratação e fixação, uma resina é infiltrada nas amostras, geralmente epóxi ou metacrilato, formando uma cobertura semelhante a um plástico enrijecido. Em seguida, as amostras são cortadas em um ultramicrotomo, usando um diamante ou lâmina de vidro, numa espessura de aproximadamente 90 nm, e, então, colocadas em grades de cobre, que compõem o MET. Geralmente, essas grades são revestidas com um fino filme de polímero, para auxiliar no suporte dos cortes. O urânio ou o chumbo são os metais usados para corar os cortes ultrafinos, portanto as grades são colocadas em uma coluna e os elétrons são transmitidos através da amostra, que pode ser vista por fosforescência (ZOTTOLA, 1997).

Existem diversos métodos disponíveis para determinação de células viáveis nas superfícies utilizadas para o processamento de alimento. Após a coleta pela remoção dos microrganismos aderidos por meio de rinsagem, raspagem, *swab* ou uso de vórtex, seguem-se a diluição da amostra em diluente esterilizado, inoculação da amostra em placas de Petri, adição de meio nutriente, incubação em temperatura adequada, por um intervalo de tempo predeterminado, e contagem do número de colônias formadas (ZOTTOLA, 1997).

Alguns aspectos devem ser considerados quando se utilizam métodos não-visuais: todas as células sésseis aderidas à superfície precisam ser removidas, não devendo conter células não-aderidas (não-fixadas) ou planctônicas. Também, os diferentes microrganismos presentes na amostra devem crescer nas condições de cultivo preestabelecidas e os resultados devem refletir a realidade do biofilme (ZOTTOLA, 1997).

A medida de impedância se baseia no princípio de que, ao se metabolizarem os componentes presentes num meio de cultura, os microrganismos transformam moléculas grandes em pequenas, que possuem cargas elétricas, o que leva à mudança da resistência ou impedância do meio; a mudança da condutividade pode ser medida; e o número de microrganismos aderidos à superfície está relacionado com o valor obtido para a condutividade (SCHWACH e ZOTTOLA, 1982).

O conteúdo de ATP na célula bacteriana é constante, podendo ser medido de maneira relativamente simples. A quantidade de ATP presente em uma amostra pode ser determinada por uma reação bioluminescente entre o

complexo que contém luciferina e a enzima luciferase. Quando o ATP está presente em excesso, o máximo da intensidade da luz emitida é proporcional à quantidade de ATP presente na célula, e a quantidade de luz pode ser medida por um aparelho conhecido como luminômetro (SCHWACH e ZOTTOLA, 1982). Uma restrição a esse método é que a maioria das amostras, como alimentos ou outros materiais biológicos, também contém ATP, não podendo ser utilizado nessas condições; porém, ele é aplicável na avaliação de superfícies de processamento de alimentos, para se determinar o nível de material orgânico existente, podendo se correlacionar à eficiência do procedimento de limpeza e à sanitização em indústrias de alimentos. Nesse caso, existem no mercado diversos *kits* portáteis que são relativamente fáceis de serem manipulados e fornecem resultados em poucos minutos após a coleta da amostra na superfície por meio de *swab* próprio (COSTA *et al.*, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em uma unidade de processamento de leite e derivados com capacidade de recebimento de leite de aproximadamente 10.000 L/dia. Todo leite é recebido na forma granelizada, de 50 produtores. A unidade processa leite dos tipos B, C e desnatado, adicionados de vitaminas A e D, requeijão, doce de leite, iogurte, manteiga e, eventualmente, queijo minas frescal e mussarela. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Higiene Industrial, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

A unidade de processamento não tinha ainda implementado um programa de Boas Práticas de Fabricação, mas era realizado um controle de qualidade por um responsável técnico. As áreas da planta eram divididas em plataforma de recepção (420 m³), sala de pasteurização (600 m³), sala de embalagem de leite pasteurizado (80 m³), sala de fabricação de manteiga e doce de leite (330 m³), sala de queijo (330 m³) e sala de iogurte (300 m³).

3.1. Avaliação da ocorrência de estafilococos em uma indústria de processamento de leite e derivados

3.1.1. Contagem de *Staphylococcus* spp. em amostras de ar de ambientes de processamento

As amostras do ar foram coletadas, em duplicata, em seis ambientes de processamento predeterminados de uma indústria de laticínios: plataforma de recepção (PR), pasteurização de leite (PL), embalagem de leite pasteurizado (ELP), processamento de manteiga e doce de leite (PMDL), processamento de queijos (PQ) e produção de iogurte (PI). Os locais de amostragem foram estratificados, considerando a separação física já existente dos setores da unidade de processamento. Na sala de produção de manteiga e de doce não havia divisão física, portanto representaram um único ambiente.

A avaliação da qualidade microbiológica do ar dos ambientes foi realizada pelo método de impressão do ar do ambiente em ágar Baird Parker, para detecção e contagem de *Staphylococcus* spp. Foi utilizado o amostrador de ar MAS 100 (Merck®) de um estágio. Esse equipamento permite a coleta de volumes de 100 litros de ar por minuto, o que facilita o isolamento de microrganismos mesmo em baixas concentrações. Foram realizadas cinco repetições semanais para cada ambiente (EVANCHO *et al.*, 2001).

Foi coletado um volume de 1.000 litros de ar. A contagem de *Staphylococcus* spp. foi realizada em ágar Baird-Parker, para permitir melhor recuperação desses microrganismos do ar (BAIRD-PARKER, 1990; AOAC, 1995; MARTIN *et al.*, 2001).

Antes da coleta das amostras, a tampa do amostrador foi esterilizada a 121 °C, por 15 minutos. Para cada coleta nas diferentes áreas físicas da indústria, a tampa do equipamento foi sanitizada com álcool 70%. Após cada ciclo de fluxo de ar coletado, as placas foram removidas do amostrador, tampadas e incubadas a 37 °C, por 48 horas (EVANCHO *et al.*, 2001).

A contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foi corrigida, usando-se os dados de tabela específica do equipamento (MERCK®, 2005).

Os resultados obtidos, expressos em UFC.m⁻³ de ar, foram convertidos em log₁₀, para avaliação descritiva.

3.1.2. Contagem de *Staphylococcus* spp. em amostras de superfícies de processamento

As amostras foram coletadas em uma superfície por ambiente, nos seis ambientes de processamento, incluindo: superfície interna do tanque de estocagem de leite, situado na plataforma de recepção (plataforma de recepção), área externa do tanque de armazenamento de leite pasteurizado (sala de pasteurização), superfície da máquina de envase de leite pasteurizado (sala de embalagem de leite pasteurizado), superfície interna dos tachos de processamento de manteiga e doce de leite (sala de fabricação de doce de leite e manteiga), superfície interna do tanque de processamento de queijos (sala de fabricação de queijos) e superfície externa da máquina de iogurte (sala de produção e embalagem de iogurte), totalizando sete superfícies. Cada amostra foi coletada pela técnica do *swab*, em três áreas diferentes de um mesmo equipamento, e inoculadas em duplicata (EVANCHO *et al.*, 2001). Foram realizadas cinco repetições semanais para cada superfície, sem que a rotina normal de processamento fosse alterada. Foram utilizados *swabs* de algodão de 0,5 cm de diâmetro por 2 cm de comprimento, com haste de 12 cm de comprimento. Os *swabs* foram esterilizados a 121 °C, por 15 minutos. Para a coleta, o *swab* foi umedecido em solução-tampão fosfato, adicionada de 1% de solução tiosulfato de sódio a 0,25%, e foi friccionado, formando-se um ângulo de 30° com a superfície-teste, por três vezes no sentido vai-e-vem, em três áreas diferentes de uma mesma superfície, usando-se um molde de coleta de área de 10 cm x 10 cm. Em seguida, foram eles transferidos para tubos de ensaio que tinham a mesma solução em que foram umedecidos (EVANCHO *et al.*, 2001). Após a coleta, os tubos foram transportados para o laboratório, sob refrigeração, para realização das análises de *Staphylococcus* spp. em ágar Baird-Parker, adicionado de emulsão de gema de ovo em água salina 0,85% esterilizada (1:1) e telurito de potássio a 1 % (BAIRD-PARKER, 1990). Para o plaqueamento foi utilizada uma alíquota de 0,1 mL por placa, em duplicata (EVANCHO *et al.*, 2001).

Os resultados expressos em UFC.cm⁻² foram convertidos em log₁₀, para serem avaliados.

3.1.3. Contagem de *Staphylococcus* spp. nas mãos dos manipuladores de alimentos

A presença de *Staphylococcus* spp. nas mãos dos manipuladores foi avaliada pela técnica de *swab*, em um manipulador de cada ambiente (EVANCHO *et al.*, 2001).

A coleta das amostras foi feita em uma área correspondente às superfícies da palma e das bordas, partindo-se da região dos punhos. De forma angular, o *swab* foi friccionado, com movimentos giratórios, da parte inferior da palma até a extremidade dos dedos, retornando-se ao punho. Este procedimento foi repetido por três vezes, na direção de cada dedo. Os movimentos nas bordas foram do tipo vai-e-vem, de modo a avançar em um dos lados da mão onde as linhas dos punhos se iniciavam, passando depois entre os dedos, e no final no outro lado da mão, encontrando-se de novo com as linhas dos punhos. Em seguida, os *swabs* foram transferidos para tubos de ensaio com 10 mL de solução-tampão fosfato, acrescida de 0,25% de solução de tiosulfato de sódio, esterilizada a 121 °C, por 15 minutos. Os tubos foram transportados, sob refrigeração, para o laboratório, para realização da contagem de *Staphylococcus* spp. em ágar Baird-Parker (SILVA, 1996; EVANCHO *et al.*, 2001).

Os resultados expressos em UFC.mão⁻¹ foram convertidos em log₁₀, para avaliação descritiva.

As amostragens do ar dos ambientes, das mãos dos manipuladores e das superfícies de equipamentos foram analisadas em duplicata, tendo sido realizadas cinco repetições; uma repetição por semana, consecutivamente, no período de março a abril de 2002. Os resultados foram comparados com as especificações, conforme APHA (EVANCHO *et al.*, 2001).

3.2. Isolamento e identificação bioquímica de estafilococos isolados das amostras de ar dos ambientes, das superfícies de equipamentos e das mãos dos manipuladores

Os isolados foram obtidos do ar dos ambientes da indústria, das superfícies e dos manipuladores, sendo previamente selecionados, de forma aleatória, com base nas características típicas e atípicas das colônias em ágar Baird-Parker. Os isolados foram inicialmente submetidos às provas de produção de coagulase, catalase e β -hemólise (MARTIN *et al.*, 2001).

Os isolados foram purificados em ágar Baird-Parker (BAIRD e LEE, 1995). Foram selecionadas colônias típicas e atípicas. Colônias negras e lustrosas, devido à precipitação de telurito de potássio e halo de clarificação, em função da atividade da lecitinase, foram consideradas típicas e as colônias negras, sem halo, foram consideradas atípicas. A técnica de estrias foi utilizada para o isolamento.

Os isolados foram codificados e mantidos em agar-padrão inclinado (*Plate Count Ágar*), sob refrigeração. Posteriormente, foram submetidos a provas morfotintoriais e bioquímicas (BAIRD e LEE, 1995; ENTIS *et al.*, 2001).

Foram realizadas as provas de coloração diferencial de gram; produção de coagulase livre em plasma de coelho (BAIRD e LEE, 1995), em plasma coagulase – EDTA Coagu-Plasma LB (Laborclin); catalase, utilizando H_2O_2 a 10%; e hemólise em ágar sangue, acrescido de 5% de sangue de carneiro para verificação de β -hemólise (ENTIS *et al.*, 2001).

A identificação bioquímica das estirpes de *Staphylococcus* spp. foi realizada, empregando-se o Sistema de Identificação de estafilococos e micrococcos API Staph da Biolab-Merieux (Figura 2), composto por testes bioquímicos padronizados e miniaturizados e por base de dados específica (ENTIS *et al.*, 2001).

Foram feitas suspensões das colônias em 6 mL de API Staph Médium esterilizado (Tabela 4). As galerias individuais, contendo meios de provas bioquímicas desidratados, foram inoculadas de acordo com a recomendação do fabricante. A seqüência da galeria incluiu o controle, seguido do teste de fermentação de glicose, frutose, manose, maltose, lactose, trealose, manitol, xilitose, melobiose, nitrato de potássio (NIT), β -naftil ácido fosfato (PALM),



Figura 2 – Modelo de galeria de identificação API STAPH.

Tabela 4 – Composição do meio de suspensão e dos reagentes de leitura

Reagentes	Composição	Quantidade
API STAPH medium 6 MI	Extrato de levedura	0,5 g
	Bactopeptona	10 g
	NaCl	5 g
	Oligoelementos	10 mL
	Água desmineralizada	1.000 mL
	pH: 7,0 – 7,4	
VP 1	Hidróxido de potássio	40 g
	H ₂ O	100 mL
VP 2	α-naftol	6 g
	Etanol	100 mL
NIT 1	Ácido sulfanílico	0,4 g
	Ácido acético	30 g
	H ₂ O	70 mL
NIT 2	N,N-dimetil-1-naftilamina	0,6 g
	Ácido acético	30 g
	H ₂ O	70 mL
ZYM A	Tris-hidroximetil-aminometano	25 g
	Ácido clorídrico a 37%	11 mL
	Laurilsulfato de Na	10 g
	H ₂ O	100 mL
ZYM B	Fast Blue BB	0,35 g
	2-metoxi etanol	100 mL

Fonte: API STAPH – Teste para diagnóstico *in vitro*.

piruvato de sódio (PV), rafinose, xilose, sacarose, α -metil D-glucosídeo (MDG), n-acetil glucosamina (NAG), arginina (ADH) e uréia. Após a inoculação, foram incubadas as galerias entre 35 e 37 °C, por 24 horas.

As leituras dos testes foram feitas com o auxílio dos reagentes VP 1 e VP 2 para o teste de VP; NIT 1 e NIT 2, para o teste NIT e ZYM A e ZYM B para o teste PALM. A composição de cada reagente é apresentada no Tabela 4.

Para interpretação dos resultados, seguiram-se as recomendações do fabricante, utilizando o sistema de dados do kit.

Os resultados da identificação foram apresentados em porcentagem de isolados identificados, por local de coleta.

3.3. Produção e caracterização de enterotoxinas de estafilococos isolados de amostras de ar dos ambientes, das superfícies dos equipamentos e das mãos dos manipuladores

A seleção dos isolados para avaliação de produção e caracterização de enterotoxinas baseou-se em características bioquímicas dos isolados, no percentual de confiabilidade do API STAPH e na presença e ausência de halo sem clarificação no Baird Parker (BAIRD-PARKER, 1989, 1990; HOLT *et al.*, 1994).

Foram selecionados 37 isolados, identificados com percentual de confiabilidade acima de 90% no API Staph.

3.3.1. Produção de enterotoxinas estafilocócicas

A produção de enterotoxina foi pesquisada pelo método “membrana sobre ágar”. Os isolados foram inoculados em caldo BHI e incubados por 24 horas, a 37 °C. Posteriormente, uma alíquota de 0,5 mL do caldo BHI foi inoculada em ágar BHI de concentração dupla, acrescido de 0,5 % de extrato de levedura e recoberto com membrana de diálise do tamanho semelhante ao fundo da placa de Petri (*Spectra/Por membrane dialysis tubing* – 6000 a 8000). As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas, em posição normal (ENTIS, 2001).

Após a incubação, a massa celular foi lavada com 2,5 mL de solução-tampão de NaHPO₄ 0,01 M, pH 7,4, em três etapas, usando-se 1 mL, 1 mL e 0,5 mL do tampão, nesta ordem. O líquido de lavagem foi então centrifugado por 15 minutos a 8.400 g, a 4°C, em centrífuga Beckman, modelo J2- MC. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e adicionados 100 µL de Tiomesal-Lilly, para conservação dos extratos de enterotoxinas, e então mantido sob refrigeração até o momento da análise (ENTIS, 2001).

3.3.2. Caracterização das enterotoxinas

A caracterização das enterotoxinas foi feita pelo Método de Aglutinação passiva reversa em látex "SET-RPLA". As amostras dos sobrenadantes foram agrupadas em *pools*, contendo em média três amostras de espécies, com características bioquímicas semelhantes, isoladas do mesmo local (ar de ambientes, superfícies e manipuladores). Os resultados obtidos foram confirmados em três repetições de análise. Os *pools* com resultados positivos foram desmembrados, e novos testes foram realizados para cada isolado (ENTIS *et al.*, 2001),

O teste consistiu em inocular 25 µL da amostra em placas de ELISA esterilizadas e 25 µL de partículas de látex pré-sensibilizadas com a antitoxina específica em placas de microtitulação (IGARASHI *et al.*, 1986; SANJEEV e SURENDRAN, 1992). Seguindo a recomendação de PARK e SZABO (1986), não foram utilizados os pocinhos mais externos das placas, para evitar interferência na interpretação dos resultados. Paralelamente a cada amostra, o controle negativo foi feito, inoculando-se apenas látex-controle para fins de comparação com as amostras positivas. O controle positivo foi fornecido pelo fabricante, para as quatro toxinas testadas, e foi realizado paralelamente em cada placa para comprovar a eficiência do teste. As fotografias do kit SET-RPLA (OXOID®) e o modelo de placa de ELISA inoculada estão apresentados na Figura 3.

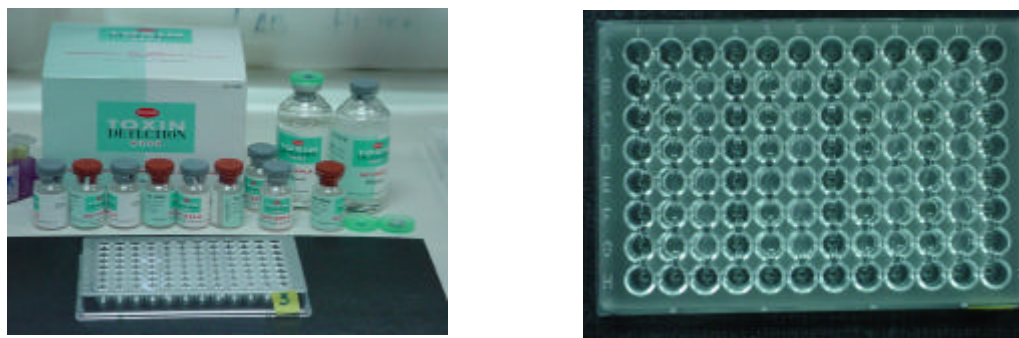


Figura 3 – SET-RPLA (OXOID®) e um modelo de placa de Elisa Inoculadas com espécies de *Staphylococcus* spp.

Com a finalidade de eliminar possíveis reações inespecíficas, foi acrescentado inicialmente ao extrato de toxina 5% de IgG Normal de coelho, obtida na Fundação Ezequiel Dias/Belo Horizonte – MG (FUNED), para cada 100 μ L de extrato (PEREIRA *et al.*, 1997; ENTIS *et al.*, 2001).

Após a inoculação as placas de microtitulação foram mantidas entre 20 e 25°C, por 24 horas, sem agitação. As leituras dos resultados foram realizadas contra a luz, ou sob um fundo escuro, para melhor visualização das reações.

As reações positivas foram caracterizadas pela formação de aglutinação com escores entre 1 e 4. Nas reações negativas, verificou-se a formação de *boton* (sedimento) róseo, semelhante ao controle negativo, conforme descrito nas instruções do Kit SET-RPLA.

3.4. Capacidade de adesão de estafilococos isolados do ar dos ambientes, das superfícies dos equipamentos e das mãos dos manipuladores em superfícies de processamento

3.4.1. Microrganismos e superfícies avaliadas

Foram selecionados quatro isolados: *S. aureus*, isolado das mãos do manipulador de alimentos, não-produtora de enterotoxina; *S. epidermidis*, isolado do ar dos ambientes, produtor de enterotoxina EEA e SED; *S. xylosum*, isolado da superfície, produtor de enterotoxina EEA, EEB, EEC e EED; e *S. saprophyticus*, isolado das mãos do manipulador, produtor de EEA, EEB, EEC e EED. Os isolados foram mantidos em ágar BHI e, posteriormente, avaliados

quanto à capacidade de adesão em superfícies de polipropileno, polietileno de baixa densidade, aço inoxidável AISI 304 #4 e vidro, amplamente utilizadas na indústria de alimentos.

3.4.2. Determinação da adesão

As superfícies, representadas por cupons com dimensões de 10 x 10 mm, foram limpas por escovação, usando-se escova de cerdas macias e água e detergente líquido neutro, rinsadas com água destilada e imersas em acetona, durante 30 minutos, para intensificar a remoção de gordura. Posteriormente, foram imersas em solução NaOH a 1%, por 1 hora. Foram novamente rinsadas e secas ao ar, em temperatura ambiente. As superfícies de aço inoxidável, polipropileno e vidro foram então envolvidas em papel absorvente e papel alumínio e esterilizadas em autoclave, a 121° C, durante 15 minutos. Os cupons de polietileno de baixa densidade foram esterilizados em câmara de luz ultravioleta, por 15 minutos (PARIZZI, 2004).

Os isolados selecionados foram ativados por duas vezes consecutivas, a partir da cultura-estoque, em caldo BHI, e incubadas a 30 °C, por 24 horas. As análises de adesão foram iniciadas 12 horas após a última ativação. Os cortes das superfícies, com área de 1 cm², foram imersos em caldo BHI e inoculados com aproximadamente 10³ a 10⁵ UFC.mL⁻¹ da cultura-teste. As condições de adesão bacteriana foram padronizadas a 30 °C, em banho-maria, com avaliações da quantidade de células aderidas por cm², após 24 horas de incubação.

3.4.3. Determinação do número de *Staphylococcus* spp. aderidos pela técnica de microscopia de epifluorescência

A adesão dos isolados de estafilococos foi avaliada pela técnica de microscopia de epifluorescência. Os cupons foram removidos do meio de cultura com o auxílio de uma pinça esterilizada e, posteriormente, rinsados, de forma cautelosa, com 10 mL de solução-tampão fosfato esterilizada (KH₂PO₄, pH 7,0), por 1 minuto, para remoção das células não-aderidas ou plânctônicas.

Em seguida, os cupons foram depositados sobre uma lâmina de vidro, previamente colocada dentro de uma placa de Petri, ambas esterilizadas, e cobertos com solução de Kirkpatrick (álcool isopropílico, clorofórmio e formaldeído na proporção 6:3:1), para fixação das células, durante 3 minutos. Logo após, adicionou-se o corante alaranjado de acridina P.A 0,04 %, por 5 minutos, para coloração das células aderidas. A observação da adesão foi feita em microscópio LEICA DC 300F, adaptado para epifluorescência (BIER *et al.*, 2001).

Para contagem ao microscópio, foram observadas células fluorescentes, alaranjadas. Foram contados de cinco campos a dez campos, conforme recomendação de Bier *et al.* (2001). Em seguida, o número médio de células por campo foi multiplicado pelo fator 3.400, obtendo-se a contagem direta ao microscópio (CDM).cm⁻² (BIER *et al.*, 2001). Cada célula ou grupo de células foi considerado 1 CDM. Estabeleceu-se que 1 CDM corresponde a 1 UFC. Os resultados foram expressos em UFC.cm⁻².

3.5. Análise dos resultados

O logaritmo decimal do número em UFC.m⁻³ das amostras de ar dos ambientes, das superfícies dos equipamentos em UFC.cm⁻² e dos manipuladores em UFC.mão⁻¹ foi submetido à análise de variância (ANOVA). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com os fatores que envolviam seis ambientes, seis manipuladores e seis superfícies, com cinco repetições de coleta, em uma unidade de processamento de laticínios.

Realizou-se a análise descritiva dos resultados de isolamento e identificação de estafilococos, considerando o percentual das espécies isoladas do ar dos ambientes, das superfícies dos equipamentos e das mãos dos manipuladores.

O logaritmo decimal do número de UFC.cm⁻² de células microbianas aderidas às superfícies foi submetido à análise de variância (ANOVA), tendo o experimento sido conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), avaliando quatro isolados: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. xylosus* e *S.*

saprophyticus submetidos à adesão em quatro superfícies: polipropileno, polietileno de baixa densidade, aço inoxidável AISI 304 #4 e vidro. As médias de adesão foram submetidas ao teste de Duncan, a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Contagem de *Staphylococcus* spp. em amostras de ar dos ambientes de processamento, das superfícies dos equipamentos e das mãos dos manipuladores em uma unidade de processamento de uma indústria de laticínios

Na Tabela 5 estão as médias dos logaritmos dos números de *Staphylococcus* spp. no ar dos ambientes de processamento, das superfícies dos equipamentos e nas mãos dos manipuladores em um laticínio e os respectivos desvios-padrão.

Não houve diferença ($p > 0,05$) no grau de contaminação por *Staphylococcus* spp. nas amostras de ar dos diferentes ambientes da indústria, nas superfícies dos equipamentos e nas mãos dos seis manipuladores avaliados. No entanto, a presença de estafilococos foi detectada nos locais avaliados, indicando que este grupo microbiano encontra-se disseminado nos ambientes de processamento, podendo contaminar, portanto, os alimentos produzidos.

Para o ar dos ambientes, foram determinadas as contagens médias de $0,6 \pm 0,007121 \log \text{UFC.m}^{-3}$ (Tabela 5).

Salustiano *et al.* (2003) constataram para os mesmos ambientes do mesmo laticínio avaliado neste experimento número de *Staphylococcus* spp. semelhante, com contagens de $0,63 \log \text{UFC m}^{-3}$.

Tabela 5 – Logaritmo da contagem do número de *Staphylococcus* spp. isolados do ar dos ambientes de processamento, da superfície dos equipamentos e das mãos dos manipuladores em uma indústria de laticínios e seus respectivos desvios-padrão

		Desvio-Padrão
Ar de ambientes (Log UFC.m⁻³)		
Plataforma de recepção	0,60	0,001561
Sala de pasteurização	0,60	0,003738
Sala de embalagem de leite pasteurizado	0,62	0,026241
Sala de doce de leite e manteiga	0,61	0,005481
Sala de queijo	0,60	0,002345
Sala de iogurte	0,61	0,003363
*Média	0,60	0,007121
Superfícies de equipamentos (Log UFC. cm⁻²)		
Tanque de recepção	1,20	0,19
Pasteurizador	1,58	1,66
Embaladeira	0,60	0,29
Mesa de embalagem e manteiga	0,72	1,17
Tanque de coagulação	0,45	0,14
Tanque de fermentação	1,55	1,63
*Média	1,01	0,84
Manipuladores (Log UFC. mão)		
Manipulador 1	2,89	1,77
Manipulador 2	1,65	1,67
Manipulador 3	2,14	1,83
Manipulador 4	1,67	1,86
Manipulador 5	1,08	0,92
Manipulador 6	1,56	1,53
*Média	1,83	1,59

* Médias de cinco repetições.

Amostradores de ar têm sido usados para contagens de microrganismos em ambientes de processamento de indústrias de carnes (CUNDITH *et al.*, 2002), de laticínios (SALUSTIANO *et al.*, 2003) e de ovos (NORTHCUTT *et al.*, 2004). Na indústria de carnes, as contagens foram de 1,27 log UFC.m⁻³ de mesófilos aeróbios e de 1,93 log UFC.m⁻³ de fungos filamentosos e leveduras. No laticínio, foram determinadas contagens de 1,56 e 1,70 log UFC.m⁻³, para esses mesmos grupos microbianos, respectivamente. Na indústria de ovos, em função do local de coleta de amostras, o ar apresentava contaminações muito

altas, atingindo 6,9 e 5 log UFCm⁻³ de mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras, respectivamente, mostrando que áreas com ar resfriado foram as de menor contaminação, com 3,5 log UFC.m⁻³ para mesófilos aeróbios e 3,7 log UFC.m⁻³ para fungos, filamentos e leveduras. Observa-se que os resultados encontrados nessas pesquisas indicam que o ar desses ambientes não atendia à recomendação de 1,95 UFC.m⁻³ da APHA (EVANCHO *et al.*, 2001).

A técnica de impressão em ágar permitiu a detecção e contagem de estafilococos no ar. A técnica de sedimentação simples apresenta limitações para o isolamento de microrganismos do ar, especialmente quando o número é baixo, como ocorre para estafilococos (EVANCHO *et al.*, 2001). De acordo com Salustiano *et al.* (2003), a técnica de impressão em ágar permite a recuperação de duas a dez vezes mais células microbianas do que a técnica de sedimentação simples.

Não existem padrões na legislação brasileira quanto à contagem de *Staphylococcus* spp. no ar, nas superfícies ou nas mãos de manipuladores para avaliar condições higiênicas dos ambientes de processamento de alimentos. Existe na literatura a recomendação para que as contagens de mesófilos nas superfícies sejam de no máximo 90 UFC.m⁻³, quando a avaliação é feita pela técnica da impressão em ágar, e de 30 UFC.cm⁻².semana⁻¹, para a técnica de sedimentação simples (EVANCHO *et al.*, 2001).

Um alto percentual de amostras de ar, com contagens de mesófilos aeróbios superiores à recomendação da APHA (EVANCHO *et al.*, 2001), tem sido constatado em ambientes de processamento de alimentos, indicando a necessidade de implantação de práticas adequadas de desinfecção ambiental. Pela técnica de sedimentação simples, em 85,7% das amostras de ar de ambientes numa indústria de fabricação de pão de queijo, foram encontradas contagens superiores à recomendação da APHA para mesófilos aeróbios (TOMICICH *et al.*, 2005). Um alto percentual de ambientes (82 %) que não atendiam à recomendação de 30 UFC.cm⁻².semana⁻¹ também foi detectado em unidades de alimentação e nutrição (SILVA *et al.*, 2003)

A presença de *Staphylococcus aureus* foi constatada em 78 salas de resfriamento, em nove de 15 indústrias de alimentos, envolvendo o processamento de carne e produtos lácteos. Em unidades de alimentação para

o preparo de comida chinesa, preparo de saladas e embalagem de carne cozida, as contagens máximas dos microrganismos mesófilos aeróbios variaram entre 1,1 e 1,7 log.UFC.cm⁻² (EVANS *et al.*, 2004).

Estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de alimentos e de ambientes de processamento de alimentos mostraram resistência relativamente maior a um composto de amônia quaternária, quando comparada com a resistência de *Listeria monocytogenes* coliformes e bactérias do ácido láctico, e menor que *Pseudomonas* spp. (LANGSRUD *et al.*, 2003).

Para os equipamentos foram constatadas as contagens médias, 1,01 ± 0,84 log UFC.cm⁻² (Tabela 5). As contagens de *Staphylococcus* spp. nas superfícies dos equipamentos não atenderam nem mesmo às recomendações para aeróbios mesófilos, propostas pela APHA (EVANCHO *et al.*, 2001), pois todas apresentavam contagens acima de 2 UFC.cm⁻², ou seja, logaritmo acima de 0,3 UFC.cm⁻². Portanto, as superfícies encontravam-se em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias.

Tomich *et al.* (2005), ao avaliarem as boas práticas de fabricação em indústria de pão de queijo, observaram que 85,7% das superfícies de equipamentos apresentavam contagens acima 0,3 log UFC.cm⁻² para mesófilos aeróbios.

Para as mãos dos manipuladores foram determinadas as contagens médias 1,83 ± 1,59 log UFC.mão⁻¹ (Tabela 5). Em relação a *Staphylococcus* spp., SILVA *et al.* (2003) sugerem que a contagem desse grupo microbiano não deve ultrapassar 150 UFC.mão⁻¹ (2,17 log UFC.mão⁻¹) para manipuladores de alimentos. Nesse experimento, a média das contagens das mãos dos manipuladores foi de 1,83 log UFC.mão⁻¹, resultado que atende à recomendação anterior (Tabela 5).

Em pesquisa realizada unidades de alimentação e nutrição, SILVA *et al.* (2003) verificaram que 71,9% dos manipuladores apresentavam contagens de *Staphylococcus* spp. de até 10² UFC.mão⁻¹. A presença de *Staphylococcus aureus* em 100% dos funcionários antes da higienização das mãos foi constatada em unidades de alimentação e nutrição; após a higienização das mãos esses microrganismos não foram detectados.

Tomich *et al.* (2005) verificaram que 46,7% das mãos de manipula-dores de indústria de processamento de pão de queijo apresentavam-se contaminadas com estafilocos coagulase positivos.

Em ambientes hospitalares, contaminações por *S. aureus* em mãos de manipuladores também têm sido motivo de preocupação. Kac *et al.* (2005) constataram a presença de *S. aureus* nas mãos de 12 profissionais da saúde, avaliados em um hospital, como componente da microbiota transiente antes da higienização e mesmo após a higienização. Após a higienização, *S. aureus* foi ainda isolado de um indivíduo. Além disso, 25% das estirpes de *S. aureus* eram resistentes à meticilina.

Portanto, como parte integrante de qualquer programa de segurança alimentar nas indústrias de alimentos, os manipuladores representam uma das principais fontes de contaminação. Embora ainda não existam padrões oficiais na legislação brasileira, a simples presença de estafilococos nas mãos de manipuladores pode indicar condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Esse fato evidencia a necessidade real de capacitação dos funcionários que têm contato direto com a linha de produção dos alimentos, independentemente dos tipos de estabelecimentos.

4.2. Isolamento e identificação bioquímica de estafilococos isolados das amostras de ar dos ambientes, das superfícies dos equipamentos e das mãos dos manipuladores

Foi isolado e identificado um total de 137 espécies de estafilococos, e deste, 46 (33,5 %) foram provenientes do ar dos ambientes de processamento, 51 (37,22%) das mãos dos manipuladores e 40 (29,1%) das superfícies dos equipamentos que entram em contato com alimento. Do total de isolados, 65,7% foram coagulase negativos e 34,3%, coagulase positivos. Dentre os isolados coagulase negativos 5,5% foram identificados como *S. aureus*, e

dentre os isolados coagulase positivos 84,6% foram identificados como *S. aureus*. Esse resultado pode servir de subsídios para a legislação vigente, que exige a análise de estafilococos coagulase positiva em alimentos (BRASIL, 2001).

A coagulase livre, uma enzima produzida por algumas espécies de estafilococos, principalmente por *S. aureus*, apresenta a característica de formar coágulos em reação com plasma de soro de coelho e tem sido amplamente utilizada para a identificação de *S.aureus* patogênicos. Outros testes também são utilizados para correlacionar o indicativo da produção de enterotoxina como a termonuclease e a proteína A (SPERBER e TATINE, 1975; CHANG e HUANG, 1995, 1996).

Uma análise microbiológica da superfície das mãos dos funcionários em um matadouro-frigorífico durante o processo operacional, em diferentes seções revelou a ocorrência de 17,38% de estafilococos coagulase positivos (PEREIRA e PEREIRA, 2005).

Por outro lado, diversas pesquisas têm demonstrado a alta incidência de isolados de estafilococos coagulase negativos. Martins *et al.* (2002) analisaram a cavidade bucal 68 indivíduos e constataram que 65 (95,6%) apresentavam *Staphylococcus* spp., sendo, do total de estirpes, 41 (63%) coagulase negativas. Pereira *et al.*, (2001), em condições de laboratório, inocularam espécies de estafilococos coagulase negativos em leite integral esterilizado e presunto cozido e observaram, após 48 horas de incubação, uma população de 10^6 e 10^8 UFC.mL⁻¹, respectivamente. No entanto, não foi detectada a produção de enterotoxina quando avaliada pelas técnicas de ELISA-Set-EIA e RPLA.

Do total de 32 espécies de estafilococos citadas por *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (HOLT *et al.*, 1994) e por Martin *et al.* (2001), 13 (41%) foram isoladas nos ambientes de processamento da indústria de laticínios avaliada nesse experimento, mostrando a ampla disseminação desse grupo microbiano. Apesar de *Staphylococcus aureus* ser a espécie mais associada às intoxicações alimentares, sabe-se que outras, como *S.intermedium*, *S. hyicus* e *S. sciuri*, também são capazes de produzir enterotoxinas, porém em menores quantidades (MARTIN *et al.*, 2001; SILVA e GANDRA, 2004; PEREIRA e PEREIRA, 2005).

Foram identificadas 11 espécies de estafilococos provenientes do ar dos ambientes, sendo prevalentes as espécies *S. xylosus*, *S. lentus* e *S. aureus*, com percentuais de identificação de 13,05 13,05 e 10,86 %, respectivamente (Tabela 6). Este resultado indica a importância do ar como veiculador de espécies de estafilococos dos alimentos. Sabe-se que a partir do ar esses microrganismos podem ser disseminados por meio de aerossóis, que são definidos como partículas sólidas ou líquidas suspensas no ar, contendo ou não células microbianas e viáveis ou esporos (KANG e FRANK, 1990, SALUSTIANO, 2003). Pesquisas demonstram como fontes de aerossóis, nas áreas de processamento de produtos lácteos, a atividade de pessoal, os drenos do piso, os sistemas de ventilação, a comunicação entre salas distintas, os resíduos de leite no piso e os sistemas de transporte de água, principalmente quando esta é usada sob pressão (HEDRICK e HELDMAN, 1969; HELDMAN, 1974; KANG e FRANK, 1989).

Quaisquer superfícies onde os microrganismos possam se aderir ou se depositar irão agir como fontes de contaminação do ar (HELDMAN, 1974). Nas superfícies de equipamentos de onde foram isoladas sete espécies, as mais prevalentes foram aquelas encontradas também para o ar dos ambientes que, no entanto, apresentaram percentuais de identificação diferentes: o *S. aureus* com 27,5% e *S. xylosus* com 25,0% e *S. lentus* com 7,5% (Tabela 6).

Foram identificadas dez espécies diferentes de isolados de estafilococos nas mãos dos manipuladores. *S. aureus* foi a espécie mais prevalente entre os manipuladores (21,59%), seguido de *S. epidermidis* (19,6%), *S. xylosus* (16,64%) e *S. warneri* (11,76%) (Tabela 6).

Pinto *et al.* (2005) determinaram o perfil de identidade pela caracterização fenotípica, pelo Sistema API-Staph de 158 espécies de estafilococos isoladas de 164 amostras de alimentos, e correlacionaram esse perfil com a presença do gene para produção de termonuclease (*nuc*) e para produção de enterotoxina (*sec*). Dentre os 93 isolados como *Staphylococcus aureus* com um

Tabela 6 – Porcentagem de isolados identificados e índice de confiabilidade de espécies de *Staphylococcus* spp. provenientes da unidade de processamento do laticínio

Ar de Ambientes		
Espécies	(%)	Índice de Confiabilidade (%)
<i>S. xylosus</i>	13,05	98,3
<i>S. lentus</i>	13,05	95,0
<i>S. aureus</i>	10,86	98,9
<i>S. haemolyticus</i>	8,69	90,5
<i>S. epidermidis</i>	8,69	95,6
<i>S. sciuri</i>	8,69	99,8
<i>S. saprophyticus</i>	4,35	85,9
<i>S. chromogenes</i>	4,35	86,4
<i>S. cohnii cohnii</i>	4,35	93,7
<i>S. capitis</i>	4,35	94,8
<i>S. lugdunensis</i>	2,18	98,6
<i>Micrococcus</i> spp.	2,18	99,8
Sem identificação*	15,22	
TOTAL (46)	100	
Superfícies		
<i>S. aureus</i>	27,50	99,8
<i>S. xylosus</i>	25,00	96,8
<i>S. lentus</i>	7,50	98,9
<i>S. epidermidis</i>	5,00	89,7
<i>S. capitis</i>	5,00	95,6
<i>S. saprophyticus</i>	2,50	94,8
<i>S. simulans</i>	2,50	95,7
Sem identificação*	25,00	
TOTAL (40)	100	
Manipuladores		
<i>S. aureus</i>	21,59	97,8
<i>S. epidermidis</i>	19,60	98,9
<i>S. xylosus</i>	17,64	99,6
<i>S. warneri</i>	11,76	95,6
<i>S. chromogenes</i>	7,85	94,5
<i>S. saprophyticus</i>	5,88	98,9
<i>S. lentus</i>	3,92	97,9
<i>S. cohnii cohnii</i>	1,96	99,8
<i>S. haemolyticus</i>	1,96	98,2
<i>S. hominis</i>	1,96	95,2
Sem identificação*	5,88	
TOTAL (51)	100	

* Isolados que não apresentaram identificação com porcentual acima de 70 % de confiabilidade pelo método de identificação bioquímica API-Staph

perfil de identidade acima de 60%, 91 apresentaram o gene *nuc* e 37, os genes *sec*.

Chapin e Musgnug (2003) constataram alta correlação entre o teste API Staph e o teste de ribotipagem (ACCU-PROB) do cromossomo 16s do rRNA, apresentando 95,7% de sensibilidade, 98,9% de especificidade, 98,5% de predição de resultados positivos e 96,7% de predição de resultados negativos, na identificação *S. aureus* em amostras de sangue de 157 pacientes.

4.3. Produção e caracterização de enterotoxinas de estafilococos isolados do ar dos ambientes, das superfícies dos equipamentos e das mãos manipuladores

Na Tabela 7 está a classificação dos tipos de enterotoxinas produzidas pelos estafilococos isolados dos ambientes de processamento da indústria de laticínios avaliada.

Os 17 isolados selecionados, que corresponderam a 12,4% do total, produziram pelo menos um dos tipos de enterotoxina. Todos os isolados produziram a enterotoxina tipo D e 94% a tipo A, sendo a espécie *S. hominis* a única que apresentou resultado negativo para o tipo A (Tabela 7). Esses resultados são relevantes, considerando que de acordo com a literatura os tipos de enterotoxinas A e D são envolvidas com maior frequência em surtos causados pela ingestão de alimentos contaminados com estafilococos, podendo ser detectadas nas formas isolada ou combinada (VARNAM e EVANS 1991; ENTIS *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2001; SORIANO *et al.*, 2002).

As espécies coagulase negativas *S. haemolyticus*, *S. sciuri* e *S. saprophyticus*, provenientes do ar dos ambientes, produziram os quatro tipos de enterotoxinas. Uma estirpe de *S. epidermidis* produziu os tipos A e D e uma outra estirpe produziu os tipos A, C, D (Tabela 7).

As espécies *S. lugdunensis*, *S. capitis* e *S. xylophilus*, também coagulase negativas, produziram todos os tipos de toxina (Tabela 7).

A espécie *S. hominis*, isolada das mãos dos manipuladores, produziu os tipos A, B, C, enquanto o isolado *S. capitis* da mesma origem produziu todos os tipos. Por outro lado, dentre os três isolados de *S. epidermidis*, um não

Tabela 7 – Identificação e classificação das enterotoxinas produzidas por espécies de *Staphylococcus* coagulase negativos por teste imunológico SET-RPLA

Espécie	Origem	Enterotoxina estafilocócica			
		EEA*	EEB*	EEC*	EED*
<i>S. lugdunensis</i>	Superfície	+	+	+	+
<i>S. capitis</i>	Superfície	+	+	+	+
<i>S. xylosus</i>	Superfície	+	+	+	+
<i>S. xylosus</i>	Superfície	+	+	+	+
<i>S. xylosus</i>	Superfície	+	+	+	+
<i>S. saprophyticus</i>	Manipulador	+	+	+	+
<i>S. hominis</i>	Manipulador	-	+	+	+
<i>S. capitis</i>	Manipulador	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	Manipulador	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	Manipulador	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	Manipulador	+	+	-	+
<i>S. saprophyticus</i>	Manipulador	+	+	+	+
<i>S. haemolyticus</i>	Ar ambiente	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	Ar ambiente	+	-	-	+
<i>S. epidermidis</i>	Ar ambiente	+	-	+	+
<i>S. sciuri</i>	Ar ambiente	+	+	+	+
<i>S. saprophyticus</i>	Ar ambiente	+	+	+	+

* EEA = enterotoxina estafilocócica A; EEB = enterotoxina estafilocócica B; EEC = enterotoxina estafilocócica C; e EED = enterotoxina estafilocócica D.

+ Refere-se à produção de enterotoxina.

- Refere-se à não-produção de enterotoxina.

produziu a toxina tipo C, enquanto os demais produziram os tipos A, B, C e D (Tabela 7).

Todas as espécies avaliadas apresentaram a característica de não produzir a enzima coagulase. Nenhum isolado da espécie *S. aureus* produziu enterotoxina, ressaltando o envolvimento das espécies coagulase negativas como produtoras de enterotoxinas, o que representa um risco à saúde pública.

Na maioria dos casos, uma mesma estirpe produziu mais de um tipo de enterotoxina (Tabela 7). Com base nos resultados, confirmou-se que não é recomendada a exclusão de estafilococos coagulase negativos, considerando a possibilidade de causarem intoxicações alimentares. Além da espécie *S. aureus*, outras também produziram enterotoxinas, o que sugere a necessidade de se rever a metodologia prevista na legislação atual para a determinação de *Staphylococcus* patogênicos em alimentos (Tabela 7).

Os resultados deste estudo evidenciam a diversidade de espécies que podem ser isoladas dos ambientes de processamento e as possibilidades de contaminação dos produtos lácteos. Dados da literatura sobre surtos de intoxicação alimentar ocorridos no Estado de Minas Gerais indicam que os principais agentes etiológicos envolvidos foram *Staphylococcus aureus* e espécies coagulase negativas enterotoxigênicas, com contaminações simultâneas de *Salmonella* e coliformes fecais, e que as principais enterotoxinas estafilocócicas associadas aos surtos foram as dos tipos A, B e C (JAMAIRA *et al.*, 2005).

No Brasil, os dados da Fundação Ezequiel Dias, em Minas Gerais, sobre surtos ocorridos por intoxicação estafilocócica identificados em diferentes regiões do Estado, entre 1995 e 2000, indicam as refeições prontas como as principais responsáveis por 52 surtos, com 9.500 pessoas acometidas e 16 óbitos (FAPEMIG, 2003).

A produção de enterotoxina B por *Staphylococcus aureus* isolado de queijo artesanal e por *Staphylococcus cohnii*, coagulase negativo, isolado de queijo industrial foi constada por NETO *et al.* (2005). Nesses produtos, as contagens de estafilococos foram iguais ou superiores a 10^6 UFC/g, tendo 32% dos isolados sido identificados como *Staphylococcus aureus*. Outras espécies também foram identificadas, gerando uma preocupação do ponto de vista de saúde pública, pois foram observadas contaminações nos queijos por espécies de *Staphylococcus cohnii* e *Staphylococcus intermedius* (NETO *et al.*, 2005).

Estudos com 93 isolados provenientes de casos de mastite causadas por *Staphylococcus aureus* foram apresentados por Freitas e Magalhães (1990). Quanto à enterotoxicidade, concluíram que apenas uma estirpe foi produtora de enterotoxina tipo A, a mais envolvida em surtos de intoxicações alimentares.

Os resultados das pesquisas têm indicado a necessidade de um teste adicional que identifique a produção ou não de enterotoxina, em função de as estirpes coagulase negativas serem associadas a surtos de intoxicação alimentar.

Um surto causado por espécies não-produtoras de coagulase envolveu 40 estudantes, na cidade de Osaka, Japão. Outro surto envolveu 264 pessoas que ingeriram alimentos contaminados por *S. epidermidis*, que é uma espécie não-produtora de coagulase, porém produtora de enterotoxina tipo A (PEREIRA *et al.*, 2005).

Os ensaios SET-RPLA e ELISA têm proporcionado melhores resultados na detecção de enterotoxinas. A diferença entre esses dois testes está no número e nas quantidades de toxinas detectadas. O SET-RPLA detecta as toxinas SEA, SEB, SEC e SED em concentrações superiores a 0,5 ng/mL (SET-RPLA *Staphylococcal Enterotoxin Test Kit*). O ELISA (RIDASCREEN®) detecta as mesmas toxinas que o RPLA, além da toxina EEE, com sensibilidade para detecção de 0,2 ng.mL⁻¹ a 0,7 ng.mL⁻¹, e em alguns casos detecta concentrações a partir de 0,1 ng/mL (ENTIS *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2001).

Existem outros kits além do SET-RPLA e ELISA (Ridascreen) para detecção de enterotoxinas mais sensíveis, porém apresentam alto custo de aquisição (ENTIS *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2001). Mathieu *et al.* (1992), avaliaram o TECRA-SE (policlonal tipo "sanduíche") como um teste conveniente, por ser de fácil interpretação de resultados.

Oliveira e Hirooka (1996) avaliaram vários métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas e concluíram que o RPLA e o ELISA (Ridascreen) são os melhores métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas e que ambos apresentam boa especificidade.

Park e Szabo (1986) avaliaram o kit RPLA e concluíram que sua especificidade em detectar enterotoxinas estafilocócicas é alta, 0,75 ng.g⁻¹ de alimento. De acordo com dados dos autores, essa especificidade aumentou para 0,5 ng.g⁻¹ de alimento (ROSE *et al.*, 1989, SANJEEV e SURENDRAN, 1992. De acordo com Park *et al.* (1994), Martin *et al.* (2001) e Entis *et al.* (2001), a especificidade do ELISA (RIDASCREEN) é de 0,3 a 0,35 ng/ mL de fluido sobrenadante de enterotoxina, o que confirma sua maior especificidade.

4.4. Adesão de isolados de estafilococos de amostras do ar dos ambientes, das superfícies dos equipamentos e das mãos de manipuladores

Houve efeito significativo da interação ($p < 0,05$) entre os logaritmos de células aderidas quando foram estudadas as espécies de *Staphylococcus* e as superfícies de polipropileno, polietileno de baixa densidade, aço inoxidável ASI 304 #4 e vidro.

Constatou-se que todas as espécies de estafilococos aderiram às superfícies, em maior ou menor grau, e que as contagens variaram entre 5 e 6 log UFC.cm⁻², o que indicou um processo de adesão bem estabelecido (Tabela 8). Constatou-se diferença (p<0,05) na adesão de *S. epidermidis* em polietileno de baixa densidade e observou-se menor adesão, com uma média de 5,16 log UFC.cm⁻² (Tabela 8).

Tabela 8 – Logaritmo (UFC.cm⁻²) do número de células de *Staphylococcus* spp. aderidas em diferentes superfícies

	Polipropileno	Polietileno	Aço Inoxidável	Vidro
<i>S. aureus</i>	5,79Aab	6,02Aab	5,88Aa	5,85Aab
<i>S. epidermidis</i>	5,64Ab	5,16Bc	5,75Aab	5,72Aa
<i>S. xylosus</i>	5,99Aab	5,96Aa	6,01Aab	5,93Aa
<i>S. saprophyticus</i>	5,59Ab	5,61Abb	5,84Aa	5,87Aab

Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula em um mesma coluna e seguidas de uma mesma letra minúscula, na mesma linha, não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

Em um estudo sobre avaliação de adesão de *S. aureus* ATCC 25923, Marques *et al.* (2005) observaram que o número de células aderidas ao vidro foi superior ao constatado para o aço inoxidável AISI 304, #4. Miller e Bassler (2000) constataram a maior adesão de *S. epidermidis* em acrílico, quando comparada com *S. haemolyticus*, ambos coagulase negativos.

Em pesquisa sobre adesão de *S. aureus* em aço inoxidável AISI 304 #4 e polipropileno, Parizzi *et al.* (2004) constataram uma contagem aproximada de 1,0 x 10⁵ UFC.cm⁻², após 12 horas de contato, portanto estes resultados são semelhantes aos encontrados nesta pesquisa.

A espécie *S. sciuri*, coagulase negativa, que neste experimento foi isolada do ar de ambientes de processamento (Tabela 6), foi estudada quanto à sua adesão em superfícies, relacionando a hidrofobicidade (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Assim, a adesão de estirpes de *S. sciuri* isoladas de tubulação de borracha de máquina de ordenha de leite foi avaliada em superfícies de aço inoxidável, vidro e polimetilacrilato. Os autores observaram que, apesar de algumas espécies terem sido classificadas como hidrofóbicas e outras como

hidrofílicas em todas as superfícies, o processo de adesão foi termodinamicamente favorável.

Um estudo sobre formação de biofilme de *S. epidermidis* em lentes de contato foi realizado (LOCATELLI *et al.*, 2004). Essa espécie, que foi isolada do ar, das superfícies dos equipamentos e das mãos de manipuladores (Tabela 6), é associada à capacidade de adesão e de síntese de cápsula em superfícies de lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e de silicone A. A espécie *S. capitis*, também isolada do ar de ambientes e superfícies, em cerca de a 5% do total de isolados (Tabela 6), e produtora das quatro enterotoxinas avaliadas (Tabela 7), é associada a processos de formação de biofilme de *Listeria monocytogenes*, aumentando entre 0,5 e 1,0 ciclo logarítmico o número do patógeno no biofilme (CARPENTIER e CHASSAING, 2004).

A microbiota de biofilmes formados em uma planta piloto e em uma indústria de laticínios comercial foi determinada nas superfícies de equipamentos nas áreas de leite cru, de pré-pasteurização e de pós-pasteurização, e ainda nas placas internas do pasteurizador (SHARMA e ANAND, 2002). Dentre os isolados gram-positivos, *Staphylococcus* spp. foi o segundo grupo microbiano detectado, com 28 e 21%, respectivamente, superando apenas por *Bacillus* spp. A espécie *S. aureus* representou 2,9% dos microrganismos isolados na linha de leite cru e 12% na linha de pós-pasteurização, não tendo sido detectada nas placas do equipamento. Outras espécies de estafilococos foram detectadas na linha de pré-pasteurização (9,1%) e pós-pasteurização (10%).

Nas Figuras 4, 5, 6 e 7 encontram-se as fotomicrografias ilustrativas, obtidas por microscopia de epifluorescência, com aumento de cerca de 1.000 x dos processos de adesão das espécies de *Staphylococcus* nas superfícies de polipropileno, polietileno de baixa densidade, aço inoxidável ASI 304 #4 e vidro.

Foram observadas células viáveis de coloração alaranjada, evidenciando o processo de adesão. O uso do corante alaranjado de acridina e da microscopia de epifluorescência permite diferenciar células viáveis de células não-viáveis. As bactérias que fluorescem ou colorem-se de alaranjada são consideradas células viáveis, por causa de predominância do ácido ribonucléico (RNA), devido a sua alta taxa metabólica de síntese protéica, e as que fluorescem verde são as inviáveis onde predomina o ácido desoxirribonucléico

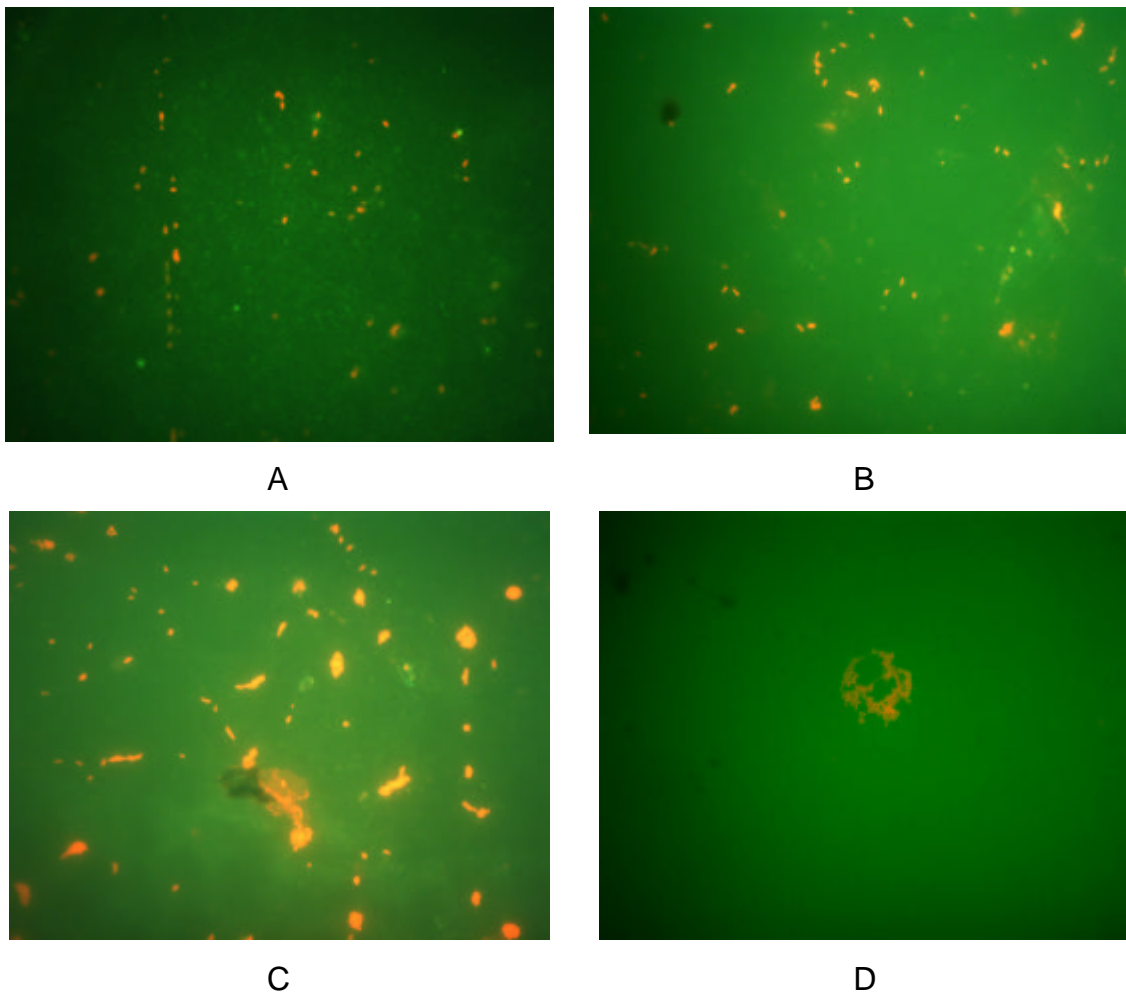


Figura 4 – Adesão em superfície de polipropileno de isolados de *Staphylococcus aureus* (A), *Staphylococcus saprophyticus* (B), *Staphylococcus xylosus* (C) e *Staphylococcus epidermidis* (D), crescidas em cultura pura, em caldo BHI a 30 °C, por 24 horas. Visualização por microscopia de epifluorescência, em microscópio LEICA DC 300F.

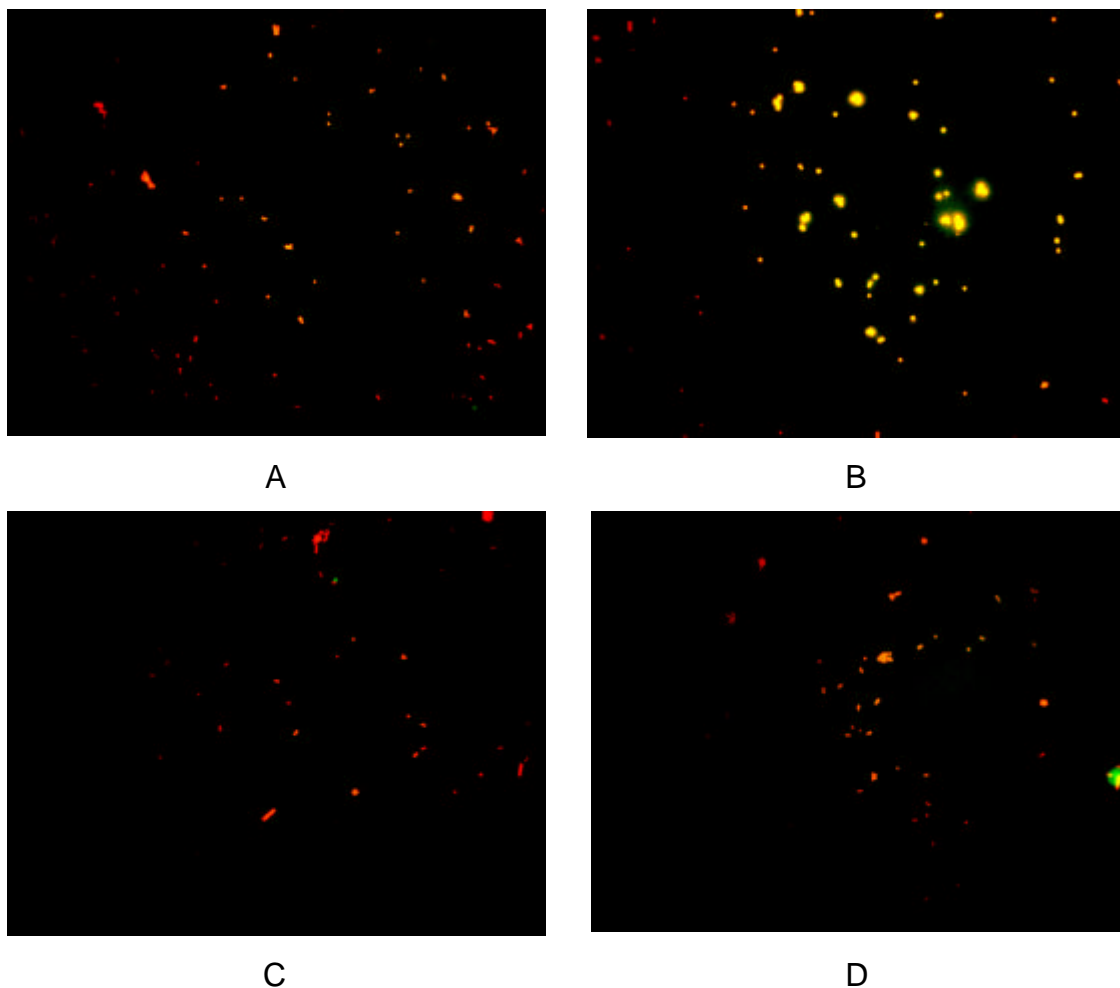


Figura 5 – Adesão em superfície de polietileno de baixa densidade de isolados de *Staphylococcus aureus* (A), *Staphylococcus saprophyticus* (B), *Staphylococcus xylosum* (C) e *Staphylococcus epidermidis* (D), crescidas em cultura pura, em caldo BHI a 30 °C, por 24 horas. Visualização por microscopia de epifluorescência, em microscópio LEICA DC 300F.

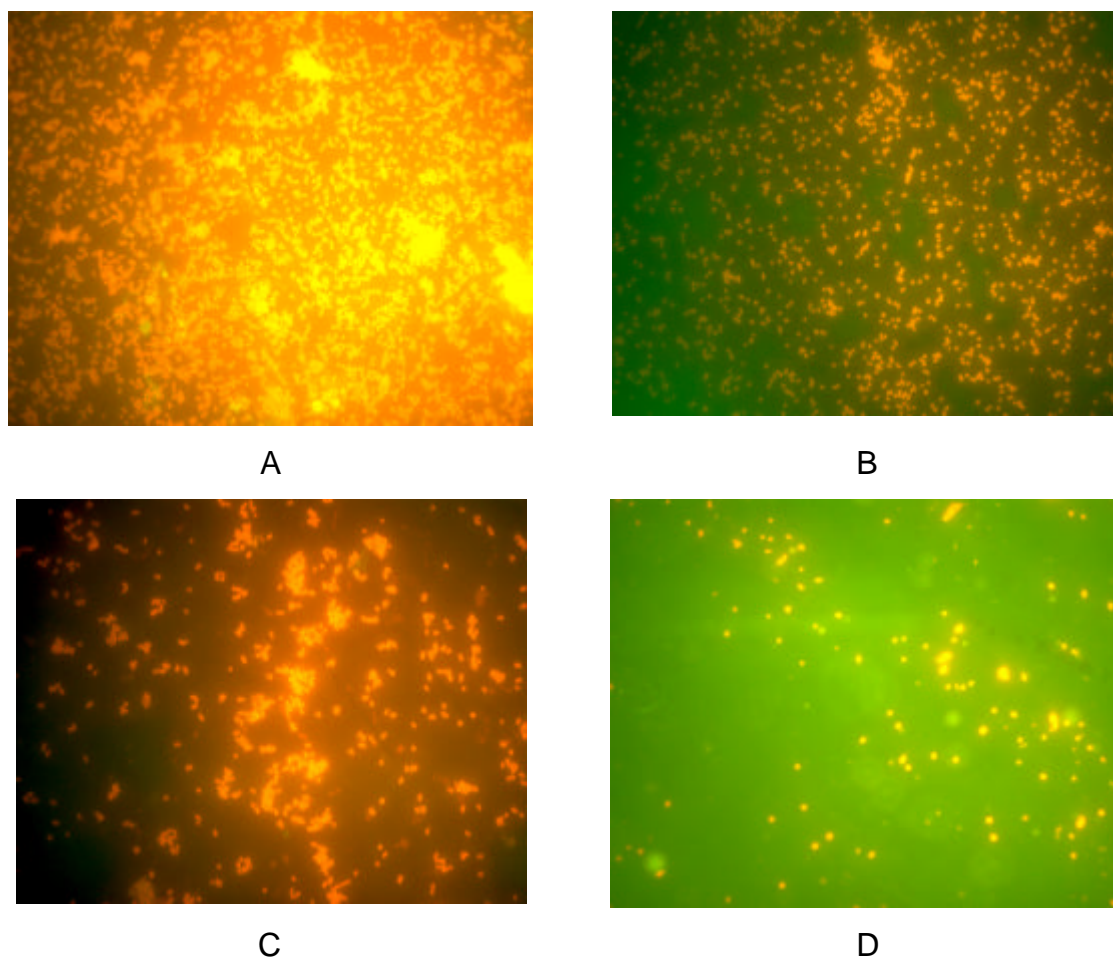


Figura 6 – Adesão em superfície de vidro de isolados de *Staphylococcus xylosus* (A), *Staphylococcus aureus* (B), *Staphylococcus epidermidis* (C) e *Staphylococcus saprophyticus* (D), crescidas em cultura pura, em caldo BHI a 30 °C, por 24 horas. Visualização por microscopia de epifluorescência, em microscópio LEICA DC 300F.

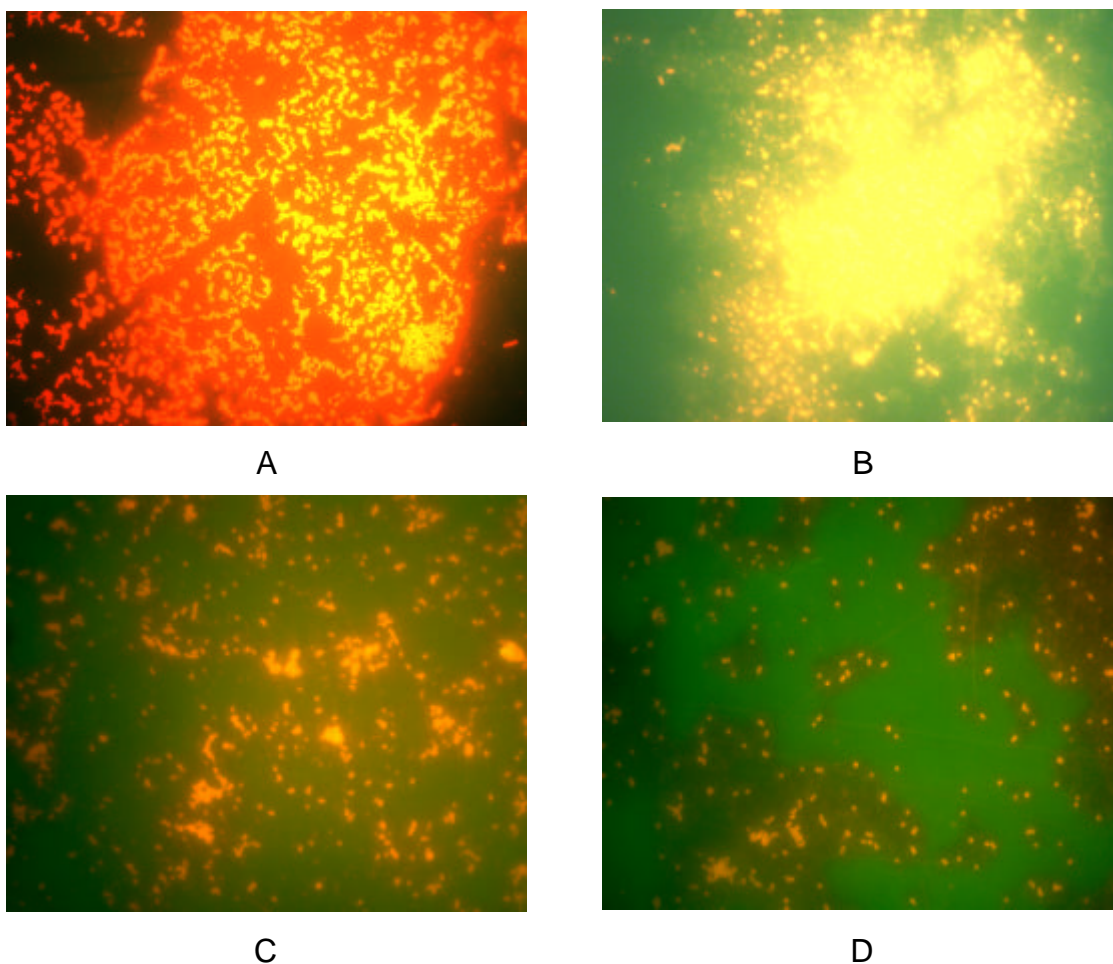


Figura 7 – Adesão em superfície de aço inoxidável AISI 304, #4 de isolados de *Staphylococcus aureus* (A), *Staphylococcus xylosus* (B), *Staphylococcus saprophyticus* (C) e *Staphylococcus epidermidis* (D), crescidas em cultura pura, em caldo BHI a 30 °C, por 24 horas. Visualização por microscopia de epifluorescência, em microscópio LEICA DC 300F.

(DNA), diferenciando assim o seu estágio de desenvolvimento metabólico. Algumas colorações intermediárias podem ocorrer, mas somente as células fluorescendo nas cores laranja ou laranja-avermelhada são consideradas viáveis.

A microscopia de epifluorescência é uma alternativa útil no estudo de visualização do processo de adesão e formação de biofilme, e na contagem de células aderidas.

5. CONCLUSÕES

A presença de *Staphylococcus* spp. foi detectada no ar do ambiente de processamento, nas superfícies dos equipamentos e nas mãos dos manipuladores em números que indicam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias na indústria avaliada.

Nos ambientes avaliados constatou-se uma ampla diversidade de espécies de estafilococos. Dentre as espécies descritas no Manual de Bergey's, 13 (40,6%) foram isoladas das amostras de ar, das superfícies dos equipamentos e das mãos dos manipuladores do laticínio, indicando a ampla disseminação desse grupo microbiano e a possibilidade de contaminação dos produtos. As espécies isoladas com maior frequência foram *S. aureus*, *S. xylosum*, *S. lentus*, *S. warneri* e *S. epidermidis*.

A produção de enterotoxinas foi constatada em 12,4 % das espécies coagulase negativas. Não foi constatada a síntese de enterotoxinas por espécies coagulase positivas. Observou-se, ainda, que os isolados produziram mais de uma toxina simultaneamente, sendo as dos tipos A e D as mais frequentes.

Os resultados deste estudo confirmam os de outras pesquisas, que indicam a produção de enterotoxinas por espécies coagulase negativas, e evidenciam a necessidade de se rever o método de análise de estafilococos coagulase positivos, recomendado pela legislação vigente, para classificar um alimento como impróprio para o consumo.

As espécies selecionadas, *S. aureus*, *S. xylosum*, *S. saprophyticum* e *S. epidermidis*, foram capazes de se aderir nas superfícies de polipropileno, polietileno de baixa densidade, aço inoxidável AISI 304 #4 e vidro, atingindo contagens entre 5,16 log UFC. cm⁻² e 6,02 log UFC. cm⁻². No entanto, a espécie *S. epidermidis* apresentou menor adesão em polietileno de baixa densidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRISHAMI, S. H.; TALL, B. D.; BRURSEMA, T. J.; EPSTEIN, P. S.; SHAH, D. B. Bacterial adherence and viability on cutting board surfaces. *Journal of Food Safety*, v. 14, p. 153-171, 1994.

ALMEIDA, R. C. C.; KUAYE, A. Y.; SERRANO, A. M.; ALMEIDA, P. S. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 4, p. 290-294, 1995.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis of International*. 16th ed. Arlington, 1995.

ARBUTHNOTT, J. P.; COLEMAN, D. C.; AZAVEBO, J. S. Staphylococcal human disease. In: JONES, D.P.; BOARD, K.G.; SUSSUMAN, M.S. (Ed.) *Staphylococci*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 19, p. 101-107, 1990.

BAIRD, R. M.; LEE, W. H. Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 26, p. 15-24, 1995.

BAIRD-PARKER, A. C. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 25, p. 12-19, 1989.

BAIRD-PARKER, A. C. The Staphylococci: an introduction. *The Journal of Applied Bacteriology*, v. 19, p. 15-85, 1990.

BANWART, G. T. *Basic food microbiology*. 2 ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989. 771 p.

BERGDOLL, M. S.; REISER, R. Application of radioimmunoassay for detection staphylococcal enterotoxins in foods. *Journal of Food Protection*, v. 43, n. 1, p. 68-72, 1980.

BERGDOLL, M. S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 10, n. 2, p. 91-99, 1990.

BIER, J. W.; SPLITTSTOESSER, D. F.; TORTORELLO, M. L. Microscopic methods. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Ed.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4th Chapter 4, p. 37-44, 2001.

BRABES, K. C. S. *Detecção de Staphylococcus spp. e suas enterotoxinas em leite proveniente de bovinos leiteiros com mastite*. 1999. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12, de 2 de Janeiro de 2001. Diário Oficial de 10 de janeiro de 2001. *Dispõe do regulamento técnico de padrões microbiológicos para alimentos*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 30 Jul. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 326, de 30 de julho de 1997. Diário Oficial de 1 de agosto de 1997. *Dispõe sobre regulamento técnico de condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores e industrializadores de alimentos*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 30 Jul. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 3.523/GM, de 28 de agosto de 1998. Diário Oficial, 31 de agosto de 1998. Seção 1. *Dispõe sobre orientação de medidas para controle do ar de interiores em ambientes climatizados*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 30 Jul. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 176, de 24 de outubro de 2000. Diário Oficial 25 de outubro de 2000. *Dispõe sobre normas e controle da qualidade do ar de interiores em ambientes climatizados*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 30 Jul. 2005.

BRECKINRIDGE, J. C.; BERGDOLL, M. S. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin producing *Staphylococcus*. *Medical Intelligence*, v. 284, n. 10, p. 542-543, 1971.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, H. M.; VARGAS, O. L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 18, n. 1, p. 57-68, 1998.

- CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. *Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, n. 1, p. 7-10, 2000.
- CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). *Revista de Microbiologia*, v. 21, n. 4, p. 320-323, 1990.
- CARMO, L. S.; LINARDI, V. R.; BERGDOLL, M. *Staphylococcus aureus* e *Salmomella enteritidis* present in food implicated in food poisoning. *Revista de Microbiologia*, v. 27, p. 122-125, 1996.
- CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R. An outbreak of staphylococcal food poisoning in the Municipality of Passos, MG, Brazil. *Brazilian Archives Biological Technology*, v. 46, n. 4, p. 581-586, 2003.
- CARPENTIER, B.; CHASSAING, D. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International of Food Microbiology*, v. 97, p. 111-122, 2004.
- CASMAN, E. P.; BENNETT, R. W. Detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Applied Microbiology*, v. 13, p. 181-189, 1965.
- CHANG, T. C.; HUANG, S. H. Evaluation of coagulase activity and protein A production for the identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*, v. 58, n. 8, p. 858-862, 1995.
- CHANG, T. C.; HUANG, S. H. Modification of the conventional procedure for the test of staphylococcal coagulase. *Journal of Food Protection*, v. 59, n. 2, p. 197-198, 1996.
- CHAPIN, A., RULE, A.; GIBSON, K.; BUCKLEY, T.; SCHWAB, K. Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation. *Environmental Health Perspectives*, v. 113, n. 2, p. 137-142, 2005.
- CHARACKLIS, W. G.; COORSEY, K. E. Biofilm and microbial fouling, *Advances Applied Microbiology*, v. 29, p. 93-137, 1983.
- CHARACKLIS, W. G. Biofilm development: A process analysis. In: MARSHALL, K. C. (Ed.) *Microbial Adhesion and Aggregation*. New York: Springer Verlag, 1996. 227 p.
- COSTA, P. D.; ANDRADE, N. J. ; PASSOS, F. J. V.; BRANDÃO, S. C. C.; FREIRE, C. G. ATP-bioluminescence as a technique to evaluate the microbiological quality of water in food industry. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, n. 3, p. 399-405, 2004.
- COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J. How bacteria stick. *Scientific American*, v. 238, p. 86-89, 1978.

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

CRIADO, M. T.; SUÁREZ, B.; FERRERÓS, C. M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. *Food Technology*, v. 48, n. 2, p. 123-126, 1994.

CUNDITH, C. J.; KERTH, C. R.; JONES, W. R.; MCCASKEY, T. A.; KUHLLERS, D. L. Air-cleaning system effectiveness for control of airborne microbes in a meat-processing plant. *Journal of Food Science*, v. 67, n. 3, p. 1170-1174, 2002.

DONNELLEY, C. B.; LESLIE, J. E.; BLACK, L. A. Production of enterotoxin A in milk. *Applied Microbiology*, v. 16, p. 917-924, 1968.

ENTIS, P.; FUNG, D. Y. C.; GRIFFITHS, M. W.; MCLINTYRE, L.; RUSSELL, S.; SHARPE, A. N.; TORTORELLO, M. L. Rapid methods for detection, identification, and enumeration. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4th Chapter 10, p. 89-126, 2001.

EUTHIER, S. M. F.; TRIGUEIRO, I. N. S.; RIVERA, F. Condições higiênic-sanitárias do queijo de leite de cabra "tipo coalho", artesanal elaborado no curimataú paraibano. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, v. 18, n. 2, p. 176-178, 1998.

EVANCHO, G. M.; SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; FRANK, J. F. Microbiological monitoring of the foods processing environment. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4th Chapter 3, p. 25-35, 2001.

EVANS, J. A.; RUSSEL, S. L.; JAMES, C.; CORRY, J. E. L. Microbial contamination of food refrigeration equipment. *Journal of Food Engineering*, v. 62, p. 225-232, 2004.

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. In: DE OLIVEIRA, T. C. R. M.; HIROOKA, E. Y. (Ed.) *Atualidades sobre a detecção de enterotoxinas estafilocócicas*. *Boletim SBCTA*, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 121-131, 1996.

FAPEMIG/FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. *Intoxicação alimentar*. Minas faz ciência, n.11. Disponível em: <<http://revista.fapemig.br/11intoxicacao.html>>. Acesso em: janeiro 2003.

FLETCHER, M. How do bacteria attach to solid surfaces? *Microbiology of the Science*, v. 4, p. 133-136, 1987.

FLINT, S. H.; BREMER, P. J.; BROOKS, J. D. Biofilms in dairy manufacturing. *Food Science & Technology*, v. 7, p. 152-157, 1996.

FRANCO, B. D. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FREITAS, M. A. Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. *Revista de Microbiologia*, v. 21, n. 4, p. 315-319, 1990.

GAVA, M. A. *Desempenho de diferentes meios de cultura utilizados na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos*. 2002. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

GOMES, H. A.; GALLO, C. R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo "C" e queijo "Minas Frescal." comercializados em Piracicaba - SP. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 2, n. 15, p. 158-161, 1995.

GÓMEZ, R. C.; CARVALHO, E. P.; COSTA, L. C. G. C. Condições microbiológicas de queijo "Minas Frescal" comercializados em Lavras - MG. *Ciência e Prática*, v. 7, n. 2, p. 111-121, 1983.

GONZALEZ, H. L.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R. Avaliação da qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. Efeito dos meses do ano. *Revista Brasileira Zootecnia*, v. 33, n. 6, p. 1531-1543, 2004.

HEDRICK, T. I.; HELDMAN, D. R., Air quality in fluid and manufactured milk products plants. *Journal Milk Food Technology*, v. 32, p. 265-269, 1969.

HELDMAN, D. R. Factors influencing air-borne contamination of foods. *Journal of Food Science*, v. 39, p. 962-969, 1974.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9. ed., Baltimore: Willians e Wilkins, 1994.

HUYS, G.; D'HAENE, K.; ELDERE, J. V.; HOLY, A. V.; SWINGS, J. Molecular Diversity and characterization of *Staphylococcus aureus* tetracycline-resistant isolates from a poultry processing plant. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 1, p. 574-579, 2005.

IGARASHI, H.; FUJIKAWA, H.; SHIGAKI, M.; BERGDOLL, M. S. Latex agglutination test for staphylococcal toxic shock syndrome. *Journal Clinical Microbiology*, v. 23, n. 3, p. 509-512, 1986.

IVANOV, V. N.; WANG, J. Y.; STABNIKOVA, O. V.; TAY, S. T. L. Microbiological monitoring in the biodegradation of sewage sludge and food waste. *Journal of Applied Microbiology*, v. 96, p. 641-647, 2004.

- KAC, G.; PODGLAJER, I.; GUENERET, M.; VAUPRÉ, S.; BISSERY, A.; MEYER, G. Microbial evaluation of two hand hygiene procedures archived by healthcare workers during routine patient care: a randomized study. *Journal of Hospital Infection*, v. 60, p. 32-39, 2005.
- KANG, Y. J.; FRANK, F. J. Biological Aerosols: A review of airborne contamination and its measurement in dairy processing plants. *Journal of Food Protection*, v. 52, n. 7, p. 512-524, 1980.
- KANG, Y. J.; FRANK, F. J. Characteristics of biological aerosols in dairy processing plants. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 621-626, 1990.
- KIM, K. Y.; FRANK, J. F. Effect of growth nutrients on attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Journal of Food Protection*, v. 57, n. 8, p. 720-726, 1994.
- KUO, J. K.; SILVERMAN, G. J. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Journal of Food Protection*, v. 43, n. 5, p. 404-407, 1980.
- LANGSRUD, S.; SIDHUA, M.; HEIRB, E.; HOLCK, A. L. Bacterial disinfectant resistance a challenge for the food industry. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 51, p. 283-290, 2003.
- LOCATELLI, C. I.; ENGLERT, G. E.; KWITKO, S.; SIMONETTI, A. B. Aderência bacteriana in vitro a lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e de silicone. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, n. 67, p. 241-248, 2004.
- MAFU, A. A.; ROY, D.; GOULET, J.; MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropilene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection*, v. 53, n. 9, p. 742-746, 1990.
- MANCINELLIT, R. L.; SHULLS, W. A. Airborne bacteria in an urban. *Environment Applied and Environmental Microbiology*, v. 35, n. 6, p. 1095-1101, 1978.
- MARTIN, E. M.; MYERS, E. R.; IANDOLO, J. J. *Staphylococcus aureus*. In: HUI, Y. H.; PIERSON, M. D. GORHAM, J. R. (Ed.) *Foodborne disease handbook*. 2nd ed., v. 1. Chapter 15, p. 345-381, 2001.
- MARTINS, C. A. P.; YUMI KOGA-ITO, C.; JORGE, A. O. C. Presence of *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. in the human oral cavity. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, p. 236-240, 2002.
- MARSHALL, V. Inoculated ecosystems in a milk environment. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 73, p. 127-135, 1992.

- MATHIEU, A.M.; ISIGIDI, B.K.; DEVRIESE, L.A. Comparison of two commercial kits for the detection of enterotoxin produced by *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Letters in Applied Microbiology*, v. 14, p. 247-249, 1992.
- MERCK. Microbial air monitoring- MAS 100 air sampler: technical information. Net. Taiwan, 2001a. Disponível em:<<http://www.merck.com.tw>>. Acesso em: março 2001.
- MERCK. Air sampler MAS 100 system. Net. U.S.A., 2001b. Disponível em: <<http://www.merck.de/english>>. Acesso em: abril 2005.
- MILLER, M.B.; BASSLER, B.L Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, v.55, p.165-199, 2000.
- MINOR, T.E.; MARTH, E.H. Staphylococcal food poisoning. Characteristics and isolation of *Staphylococci* properties of enterotoxins, and epidemiology of staphylococcal intoxications. *Indian Nutrition Dietary*, v. 9, p. 161-186, 1976.
- MITTELMAN, M. W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluids processing operations. *Journal Dairy Science*, v. 81, p. 2760-2764, 1998.
- MOSTELLER, T. M.; BISHOP, J. R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *Journal of Food Protection*, v. 56, n. 1, p. 34-41, 1993.
- NASCIMENTO, G. G. F.; FIGUEREDO, S. H. M.; UBISSES, D. M., ANTONELLI, E. M. Condições microbiológicas do leite pasteurizado comercializado em Piracicaba-SP. *Boletim SBCTA*, v. 25, n. 1, p. 13-21, 1991.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.
- NICOLAU, E. S.; NADER-FILHO, A.; AMARAL, L.A.; ROSSI-JUNIOR, O. D. Influência da mastite subclínica estafilocócica sobre as características físico-químicas e celulares do leite. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 16, n. 1, p. 35-38, 1996.
- NISKANEN, A.; KOIRANEN, L. Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources. *Journal of Food Protect*, v. 40, p. 543-548, 1977.
- NORTHCUTT, J. K.; JONES, D. R.; INGRAM, K. D.; HINTON, A.; MUSGROVE, M. T. Airborne microorganisms in commercial shell egg processing facilities. *International Journal of Poultry Science*, v. 3, n. 3 p. 195-200, 2004.

OLIVEIRA, T. C. R. M.; HIROOKA, E. Y. Atualidades sobre a detecção de enterotoxinas estafilocócicas. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 2, p. 121-131, 1996.

OMORI, G.; KATO, Y. A staphylococcal food-poisoning caused by a coagulase negative strain. *Journal Biken's*, v. 5, p. 92, 1959.

OMS – Organização Mundial de Saúde – WHO). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>> Acesso em: 15 Maio 2005.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, C. A. S; SOARES, N. F. F.; SILVA, E. A. M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Brazilian Archives Biological Technology*, v. 47, n. 1, p. 77-83, 2004.

PARK, C. E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M. K. Simple solutions false-positive staphylococcal enterotoxin assays with seafood tested with enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n. 7, p. 2210-2213, 1993.

PARK, C. E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M. K. Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n. 8, p. 2509-2512, 1992.

PARK, C. E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M. K. Evaluation of commercial enzyme immunoassay kit (Ridascreen) for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 2, p. 677-681, 1994.

PARK, C. E.; WABURTON, D.; LAFFEY, P. J. A collaborative study on the detection of staphylococcal enterotoxin in foods with an enzyme immunoassay kit (TECRA). *Journal of Food Protection*, v. 59, n. 4, p. 390-397, 1996.

PARK, C. E.; SZABO, R. Evaluation of reversed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection of staphylococcal enterotoxin A, B, C, and D in foods. *Canadian Journal Microbiology*, v. 32, p. 723-727, 1986.

PEREIRA, M. L.; HENEINE, L. G. D.; PEREIRA, J. L.; BERGDOLL, M. S. Control of nonspecific reactions on reversed passive latex agglutination assay (RPLA) for detecting nanogram quantities of staphylococcal enterotoxins. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 49, n. 4, p. 493-497, 1997.

PEREIRA, M. L. *Estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas estafilocócicas e relato de um surto por espécie coagulase positiva*. 1996. 143 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

PEREIRA, M.L., CARMO, L.S.; PEREIRA, J.L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas, em alimentos experimentalmente inoculados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, n. 2, p. 171-175, 2001.

PEREIRA, K.S.; PEREIRA, J.L. Estafilococos coagulase positiva: potenciais patógenos em alimentos. *Higiene Alimentar*, v. 19, p. 32-34, 2005.

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

RADMORE, K, HOLZAPFEL, W.H; LUCK, H. Proposed guidelines for maximum acceptable airborne microorganism levels in dairy processing and packaging plants. *International Journal of Food Microbiology*, v. 6, p. 91-95, 1988.

REN, T. J.; FRANK, F. J., Sampling of microbial aerosols at various locations in fluid milk and ice cream plants. *Journal of Food Protection*, v. 55, n. 4, p. 279-283, 1992.

RESTAINO, L.; FRAMPTON, E.W.; BLUESTEIN, R. L.; HEMPHIL, J. B.; REGUTTI, R. R. Antimicrobial efficacy of a new organic acid anionic surfactant against various bacterial strains. *Journal of Food Protection*, v. 57, n. 6, p. 496-501, 1994a.

RESTAINO, L.; HEMPHIL, J.B.; FRAMPTON, E.W.; BLUESTEIN, R. L. Hycheck™ slides versus Rodac^R plates compared to the swabs technique for the recovery of bacteria from hard smooth surfaces. *Dairy Food and Environmental Sanitation*, v. 14, n. 9, p. 529-531, 1994b.

ROBBINS, R.; GOULD, S.; BERGDOLL, M. S. Detection the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Applied Microbiology*, v. 28, n. 6, p. 946-950, 1974.

RODRIGUES, K. L., MOREIRA, A. N., ALMEIDA, A. T. S. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. *Ciência Rural*, v. 34, n. 1, p. 297-299, 2004.

ROSE, S.A.; BANKES, P.; STRINGER, M.F. Detection of staphylococcal enterotoxins in dairy products by the reversed passive latex agglutination (SET-RPLA) kit. *Journal of Food Microbiology*, v. 8, p. 65-72, 1989.

SALUSTIANO, V. C.; ANDRADE, N. J.; BRANDÃO, S. C. C.; AZEREDO, R. M.; LIMA, S. A. K. Microbiological air quality of processing areas in a dairy plant as evaluated by the sedimentation technique and a one-stage air sampler. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, n. 3, p. 255-259, 2003.

SANJEEV, S.; SURENDRAN, P. K. Evaluation of reversed latex agglutination test kits for the detection of staphylococcal enterotoxin A, B, C and D in fishery products. *Journal of Food Science Technology*, v. 29, n. 5, p. 311-312, 1992.

- SCHWACH, T. S.; ZOTOLLA, E. A. Use of scanning electron microscopy to demonstrate microbial attachment to beef and beef contact surfaces. *Journal of Food Science*, v. 47, p. 1401-1405, 1982.
- SHARMA, M.; ANAND, S. Characterization of constitutive microflora of biofilmes in dairy processing lines. *Food Microbiology*, v. 19, p. 627-636, 2002.
- SILVA, C. A. S.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F. F.; FERREIRA, S. O. Evaluation of ultraviolet radiation to control microorganisms adhering to low-density polyethylene films. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, n. 2, p. 175-178, 2003.
- SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. G. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. *Higiene Alimentar*, v. 18, n. 122, p. 32-40, 2004.
- SILVA, R. M. M. *Especificações microbiológicas para ambientes, manipuladores e equipamentos em restaurantes industriais*. 1996. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.
- SMITH, G. C.; SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; SCANGA, J. A.; TATUM J. D. Pathogen contamination of cattle and beef; Challenges and opportunities in process control. In: *Annais XXI World Buiatrics Congress*, in Punta del Este, Uruguay, p. 1-34, 2000.
- SORIANO, J. M.; FONT, G.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurants foods. *Trends in Food Science*, v. 13, p. 60-67, 2002.
- SPERBER, W. H.; TATINI, S. R. Interpretation of the coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 29, n. 4, p. 502-505, 1975.
- SPURLOCK, A. T.; ZOTOLLA, E. A. Growth and attachment of *Listeria innocua* to cast iron. *Journal of Food Protection*, v. 54, n. 12, p. 925-929, 1991.
- SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Identification and purification of new staphylococcal enterotoxin H. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 4, p. 1438-1443, 1995.
- SULLIVAN, J. J. Air microbiology and dairy processing. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 34, p. 133-138, 1979.
- TAKAZAKI, M.; SUDO, R.; NISHIMURA, O.; KIN, H. Y. Simultaneous removal of nitrogen and THM precursors by developed submerged biofilm process for drinking water. *Water Science Techology*, v. 26, n. 9, p. 2021-2024, 1992.

- TAKEUCHI, S.; ISHIGURO, K.; IKEGAMI, M.; KAIDOH, T.; HAYAKAWA, Y. Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. *Veterinary Microbiology*, v. 59, p. 251-258, 1998.
- TEIXEIRA, P.; LOPES, Z.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R.; VIEIRA, M. J. Physical-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiology*, v. 22, p. 247-251, 2005.
- TROLLER, C. E. *Sanitation in food processing*. 2. ed., New York: Academic Press, 1993. p. 52-69.
- TOMICH, R. G.; TOMICH, T. R.; AMARAL, C. A.; JUNQUEIRA, R. G.; PEREIRA, A. J. G. Metodologia para avaliação de Boas Práticas de Fabricação em indústria de pão de queijo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 115-120, 2005.
- VARADARAJ, M. C.; RANGANATHAN, B. Staphylococcal enterotoxins, methods of production and detection. *Indian Journal Dairy Science*, v. 42, n. 2, p. 267-277, 1989.
- VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. *Foodborne pathogens*. An Illustrated text. London: Mosby Year Book, 1991. 557 p.
- VICKERS, V. T. Control of airborne contamination in dairy processing plants. *Journal of Dairy Science Technology*, v. 21, p. 89-98, 1986.
- WENDPAP, L. L.; ROSA, O. O.; LIMA, M. G. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo comercializado em Cuiabá - MT. *Higiene Alimentar*, v. 11, n. 47, 1997.
- WILSON, I. G. Airborne *Campylobacter* infection in a poultry worker: case report and review of the literature. *Common Diseases Public Health*, v. 7, n. 4, p. 349-53, 2004.
- WINDERMANN, H.; LÜTHY, J.; MAURER, M. ELISA with enzyme amplication for sensitive detection of staphylococcal enterotoxin in food. *International Journal of Food Microbiology*, v. 8, p. 25-34, 1989.
- ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial. activity. *Journal of Food Bacteriology*, v. 46, p. 39-56, 1943.
- ZOBELL, C. E.; ALLEN, E. C. Attachment of marine bacteria to submerged surfaces. *Journal Bacteriology*, v. 29, p. 239-251, 1935.
- ZOTTOLA, E. A special techniques for studying microbial biofilms in food systems. In: TORTORELLO, M. L.; GREDEL, S. M. (Ed.) *Food microbiologist analysis: new technologies*. Baltimore: IFT basic symposium series, p. 315-343, 1997.

ZOTTOLA, E. A. Microbial attachment and biofilms formation: a new problem for the food industry? *Food Technology*, v. 48, n. 7, p. 107-114, 1994.

ZSCHÖCK, M.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; HAMANN, H. P.; LÄMMLER, C. Pattern of enterotoxin genes seg, seh, sei and sej positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, n. 108, p. 243-249, 2005.

7. APÊNDICE

APÊNDICE A

Tabela 1A – Resumo da análise de variância do \log_{10} contagem de ar dos ambientes ($\text{UFC} \cdot \text{m}^{-3}$), das superfícies dos equipamentos ($\text{UFC} \cdot \text{m}^{-2}$) e das mãos dos manipuladores ($\text{UFC} \cdot \text{mão}^{-1}$), provenientes de um laticínio

FV	GL	Quadrado Médio
Ar de ambiente	5	0,1490106 ^{ns}
Resíduo	24	0,125308
CV(%)		1,840
Superfícies de equipamentos	5	1,367450 ^{ns}
Resíduo	24	1,142359
CV(%)		122,510
Manipuladores	5	1,843573 ^{ns}
Resíduo	24	1,128457
CV(%)		58,036

* F, significativo, a 5% de probabilidade.

^{ns} F, não significativo, a 5% de probabilidade.

Tabela 2A – Resumo da análise de variância do \log_{10} da adesão de espécies de estafilococos e superfícies utilizadas na indústria de alimentos

FV	GL	Quadrado Médio
Espécie (ESP)	3	0,3831652*
Superfície (SUP)	3	0,844947 ^{ns}
SUP x ESP	9	0,8021409*
Resíduo	32	0,3114084*
CV(%)		3,049

* F, significativo, a 5% de probabilidade.

^{ns} F, não-significativo, a 5% de probabilidade.

Tabela 3A – Resumo da análise de variância do \log_{10} da adesão de espécies de estafilococos e nas superfícies de polipropileno, polietileno de baixa densidade, aço inoxidável AISI 304 #4 e vidro

FV	GL	Quadrado Médio
<i>S. aureus</i>	3	0,2737724 ^{ns}
Resíduo	8	0,3579727
CV(%)		3,215
<i>S. xylosus</i>	3	0,2283285 ^{ns}
Resíduo	8	0,3243816
CV(%)		1,425
<i>S. saprophyticus</i>	3	0,6533031 ^{ns}
Resíduo	8	0,4908328
CV(%)		3,868
<i>S. epidermidis</i>	3	0,2283285*
Resíduo	8	0,3243816
CV(%)		3,236

* F, significativo, a 5% de probabilidade.

^{ns} F, não-significativo, a 5% de probabilidade.