



HAL
open science

Ocorrência de *Staphylococcus coagulase positiva* em leite e queijo: identificação, perfil enzimático e biotipagem

Marcia Regina Haddad Marques, Rodrigo Prado Martins, Adelino Cunha Neto

► To cite this version:

Marcia Regina Haddad Marques, Rodrigo Prado Martins, Adelino Cunha Neto. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase positiva* em leite e queijo: identificação, perfil enzimático e biotipagem. *Higiene Alimentar*, 2006, 21 (140), pp.86-94. hal-02658834

HAL Id: hal-02658834

<https://hal.inrae.fr/hal-02658834v1>

Submitted on 30 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/258286225>

Ocorrência de Staphylococcus coagulase positiva em leite e queijo: identificação, perfil enzimático e biotipagem

Article · April 2006

CITATIONS

3

READS

92

3 authors, including:



Rodrigo Prado Martins

French National Institute for Agricultural Research

33 PUBLICATIONS 154 CITATIONS

SEE PROFILE



Adelino Cunha Neto

Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)

28 PUBLICATIONS 68 CITATIONS

SEE PROFILE

OCORRÊNCIA DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE POSITIVA EM LEITE E QUEIJO: IDENTIFICAÇÃO, PERFIL ENZIMÁTICO E BIOTIPAGEM.

Márcia Regina Haddad Marques
Instituto de Biociências- UFMT, Cuiabá, MT.

Rodrigo Prado Martins
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária- UFMT

Adelino Cunha Neto ✉
Faculdade de Ciências Médicas - UFMT

✉ dinoad@hotmail.com

RESUMO

Setenta cepas de *Staphylococcus coagulase* positiva isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e de queijo tipo Minas Frescal foram submetidas a testes bioquímicos para identificação das espécies e analisadas quanto a produção de algumas enzimas tais como: catalase, coagulase, lipase, desoxirribonuclease (DNase), hemolisinas, penicilinase, protease e termonuclease (TNase). Foram identificadas as espécies *S. aureus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. As cepas que não tiveram sua identificação confirmada permaneceram como *Staphylococcus coagulase* positiva (SCP). A espécie predominante foi *S. aureus* (51,4%) seguido dos SCP (22,8%). Todas as cepas produziram pelo menos uma ou mais enzimas analisadas, sendo *S. aureus* a única espécie que apresentou resultados

positivos na análise de todas as enzimas e obteve o maior percentual para a produção de TNase (50%).

Com relação à biotipagem, 93,3% das cepas de *S. aureus* foram consideradas de origem bovina juntamente com 100% das cepas SCP. A contaminação de alimentos por cepas patogênicas de *Staphylococcus* spp. pode resultar em problemas para a Saúde Pública, bem como em prejuízos para a indústria de alimentos.

Palavras chaves: *Staphylococcus*, enzimas, patogenicidade.

SUMMARY

Seventy strains of coagulase positive *Staphylococcus* isolated from the milk of cows with subclinical mastitis and white cheese were submitted to biochemical tests to identify the species and to check the production of the enzymes catalase, coagulase, lipase, deoxyribonuclease (DNase), hemolysin, penicillin, pro-

tease and thermonuclease (TNase). Were identified the species *S. aureus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. The strains that didn't have their identification confirmed remained as coagulase positive *Staphylococcus* (CPS). The predominant species was the *S. aureus* (51,4%) followed of the CPS (22,8%). In relation to the enzymes production, all the species produced at least one of the analyzed enzymes and the *S. aureus* was the unique species that presented positive results in the analyzes of all the enzymes. Besides, this microorganism showed the higher percentile of TNase production (50%). In the biotyping, 93,3% of the *S. aureus* and 100% of the CPS strains were considered of bovine source. Food contamination by *Staphylococcus* spp. pathogenic strains can result in Public Health problems and also in losses to the food industry.

Key words: *Staphylococcus*, enzymes, pathogenicity.

INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* compreende cerca de trinta (30) espécies, sendo rotineiramente divididas em dois grandes grupos: coagulase positiva e negativa. As espécies coagulase positivas (SCP) são reconhecidas como patógenos potencialmente sérios, devido a capacidade que esta enzima (coagulase) tem de coagular o plasma sanguíneo. As espécies que se destacam são *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. intermedius* e principalmente *S. aureus*, por estar mais associada a doenças estafilocócicas e ser o de maior interesse em microbiologia dos alimentos (CUNHA NETO, 2002; ALMEIDA FILHO & NADER FILHO, 2000).

O *S. aureus* produz uma série de enzimas que podem contribuir para a sua patogenicidade, tais como a coagulase, catalase, desoxirribonuclease (DNAse), lipase, termonuclease (TNase), bem como a toxina hemolítica, cuja produção está associada com sua virulência. Seu alto poder de colonizar várias partes do corpo, pode dar origem a infecções assintomáticas, facilitando assim a disseminação de várias doenças (SCHAECHTER et al, 2002; SILVA et al, 1997; KONEMAN et al, 1999; FRANCO & LANDGRAF, 1996; KLOSS, 1990; MARTH & HALPINDOHNLEK, 1990).

A ingestão de toxinas presentes no alimento, produzidas por cepas de *S. aureus* e outras espécies, pode causar náusea, vômito, diarreia e câibras abdominais, sendo que as enterotoxinas são termoestáveis, não sendo necessariamente destruídas após o cozimento. (SCHAECHTER, 2002; LOGUERCIO & ALEIXO, 2001; PINTO, 1999; FRANCO & LANDGRAF, 1996). Estudos evidenciaram ainda que a produção de enterotoxinas não está restrita ao *S. aureus*, sendo notada também entre outros SCP (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004; BECKER, 2001).

A maioria dos alimentos, principalmente os de origem animal, como o leite e produtos derivados, estão sujeitos a contaminação por microrganismos capazes de produzir algumas doenças no ser humano tais como, tuberculose, brucelose e outros tipos de infecção. Isto pode ocorrer devido a uma deficiência na higiene durante o processo de obtenção, manipulação, fabricação e conservação dos mesmos. Assim, o queijo assume destacada relevância, já que se trata de um produto derivado do leite e, principalmente, quando fabricado a partir de leite não pasteurizado, podendo sofrer algum tipo de contaminação por bactérias patogênicas e enterotoxigênicas (ALMEIDA & FRANCO, 2003; ISEPON et al, 2003).

A mastite é a principal doença que afeta o gado leiteiro, sendo responsável não só por prejuízos econômicos ao produtor, como também por colocar em risco a saúde da população que consome o leite e seus derivados quando contaminado, (BRITO et al, 2003; FENIMAN et al, 2003). O *S. aureus* é um dos principais causadores dessa enfermidade no mundo. De acordo com levantamentos epidemiológicos nacionais e internacionais, este microrganismo está presente em cerca de 50% das infecções da glândula mamária dos bovinos leiteiros (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

Outras espécies de *Staphylococcus* têm sido isoladas de leite de cabra e ovelha, bem como de leite bovino, no qual podem ser encontradas cerca de 15 espécies pertencentes a este gênero, como o *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. chromogenes*, entre outros (MENDONÇA et al, 1999; CUNHA NETO, 1999; NICKERSON et al, 1995; JONES et al, 1990).

Um queijo, frequentemente produzido em nosso país e que faz parte do hábito alimentar da maioria da população, é o Minas Fres-

cal, obtido pela coagulação enzimática do leite com coalho, podendo ou não ser complementada com a ação de bactérias lácticas específicas. Por ser fabricado em grande escala e de forma artesanal, não há, na maioria das vezes, uma higiene adequada por parte do manipulador, e um tratamento adequado ao leite. Sendo assim, este produto é um dos grandes responsáveis por intoxicações alimentares (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

O Minas Frescal é considerado um queijo de alta umidade (46% a 55%), tolerando um número mais provável (NMP) de 10^3 a 5×10^2 UFC/g para *S. aureus*. (Resolução – RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001/ ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Seu padrão organoléptico deve obedecer a características tais como, coloração interna esbranquiçada, consistência mole e sabor variando de levemente ácido à suave (ALVES, 2003; ISEPON et al, 2003).

A contaminação de alimentos pode ocasionar problemas de Saúde Pública, acarretar prejuízos financeiros, causar danos nas suas características químicas, físicas e organolépticas além de diminuir sua vida de prateleira. Assim, fazem-se necessárias análises microbiológicas dos alimentos, a fim de avaliar suas condições higiênicosanitárias através de seus aspectos microbiológicos (LEITÃO et al, 1988).

Objetivou-se neste trabalho averiguar as espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e queijo Tipo Minas Frescal, assim como classificá-las quanto à produção de enzimas, já que o crescimento de *Staphylococcus* spp., principalmente *S. aureus*, associado à sua capacidade de produção de enterotoxina termoestável, torna-se uma ameaça à Saúde Pública.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Foram utilizadas 70 cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas (SCP) isoladas de queijo Minas Frescal e de leites de vacas com mastite subclínica, da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências Básicas em Saúde – DCBS, Faculdade de Ciências Médicas – FCM – Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT.

As amostras de leite são originárias de 800 cabeças de gado leiteiro, distribuídas em oito propriedades na cidade de Garanhuns, PE e de 31 cabeças do rebanho de uma queijaria em Nossa Senhora do Livramento, MT. As amostras de queijo tipo Minas Frescal foram obtidas em feiras livres em Cuiabá, MT.

2.2. Identificação de *Staphylococcus* spp.

As análises foram realizadas pelo método preconizado pela American Public Health Association (APHA), que estabelece os testes bioquímicos de catalase, coagulase, acidificação de sacarose, glicose, maltose, manitol, DNase, Termonuclease e sensibilidade a Novobiocina e Nitrofurantoína para identificação das espécies (CUNHA NETO *et al.*, 2002).

2.3. Avaliação da produção de enzimas

As cepas foram analisadas quanto a produção das enzimas Catalase (Mac FADIN, 1976), Coagulase (SPERBER & TATINI, 1975), Penicilinase (PARAJE & PARAJE, 1976), Hemolisinas (CETIN, 1963), Lipase (HALPIN-DOHNALEK & MARTIN, 1990), Protease (MIEDZOBRODZKI *et al.*, 2000), Desoxirribonuclease -DNase (KONEMAN *et al.*, 1999) e Termonuclease (TNase).

2.3.1. Prova de Termonuclease (TNase)

O agar TNase foi preparado adicionando-se agar DNase, azul de orto-toluidina a 1%, cloreto de cálcio anidro a 0,1% e um tampão TRIS (SILVA *et al.*, 1997).

Após incubação das cepas em caldo BHI com 1% de extrato de levedura, em estufa a 37°C por 24hs, centrifugou-se as amostras em 3.000 rpm por 5 minutos, e em seguida, inativou-se as enzimas termolábeis em banho maria a 100°C por mais 15 minutos. Retirou-se, assim, uma

alíquota de 10µl do sobrenadante, que foi colocado em pequenos poços de 3mm de diâmetro feitos no agar. A leitura foi realizada após 4 e 24 horas. O resultado foi considerado positivo para as cepas que apresentaram formação de halo em volta da colônia, sendo este medido (em milímetros) com auxílio de uma régua (CUNHA NETO *et al.*, 2002; LACHICA *et al.*, 1971).

2.4. Teste para biotipagem de *Staphylococcus* spp.

Crescimento em agar Cristal Violeta

Realizado segundo Meyer (1967), o qual foi preparado em agar nutriente com 10µl de Cristal Violeta. A interpretação dos resultados foi realizada segundo PINTO (1999):

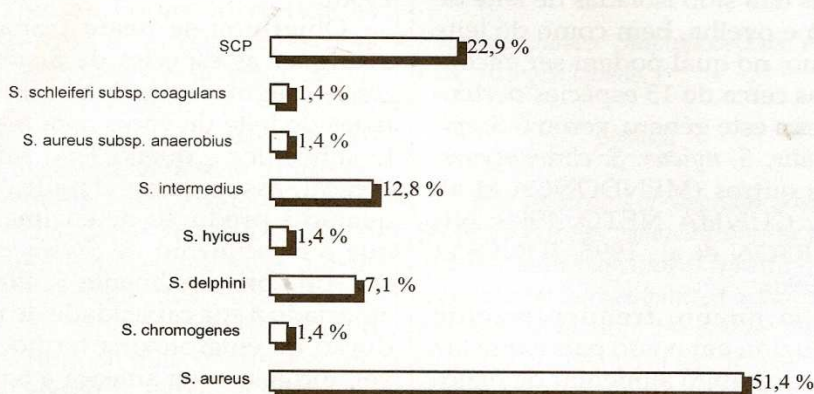
- ▲ colônias amarela; amarela-azulada – origem bovina;
- ▲ colônias violeta-azul – origem humana;
- ▲ colônias brancas; branca-azuladas – origem canina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 70 cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, isoladas de leite de vaca com mastite subclínica e queijo minas frescal, submetidas aos testes bioquímicos foram identificadas as seguintes espécies: *S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, a espécie coagulase negativa *S. chromogenes* e aquelas que permaneceram somente como *Staphylococcus* coagulase positiva. A espécie que predominou foi o *S. aureus*, com um total de 36 cepas, seguido das espécies que permaneceram como coagulase positiva, 16 cepas (Figura I).

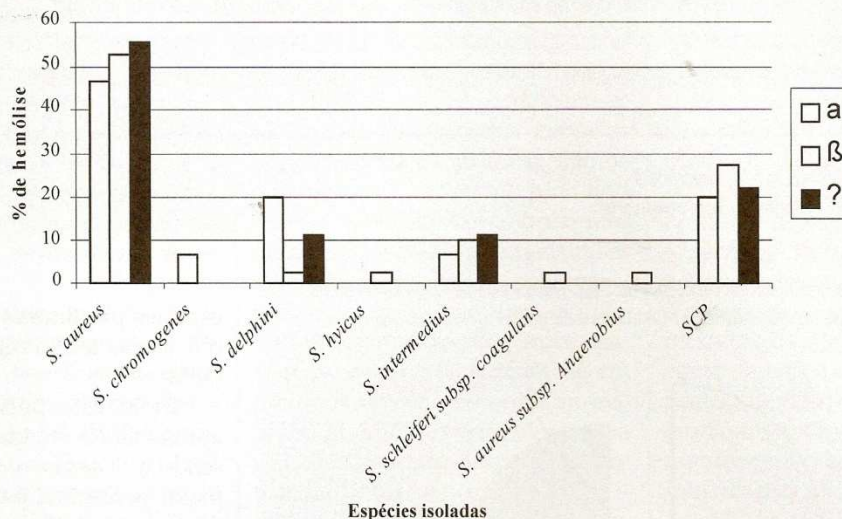
Além do *S. aureus*, outras espécies podem ser isoladas tanto de leite de cabra, ovelha e bovino. Em pesquisas realizadas em âmbito nacional e internacional, as espécies coagulase positiva comumente en-

Figura I. Frequência de cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas das amostras de leite e queijo Minas Frescal.



PESQUISAS

Figura II. Tipos de hemólise produzidas por cepas de *Staphylococcus* spp. (comportamento em ágar sangue de carneiro à 2%).



contradas são *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* (SÁ et al, 2000; ROBERSON et al, 1996; FREITAS & MAGALHÃES, 1990).

Isto se justifica pelo fato de em muitas fazendas ou locais onde há produção de leite e/ou fabricação de queijos, não haver nenhuma medida de desinfecção dos tetos, rotineiramente padronizadas, antes ou após a ordenha e nem uma assepsia adequada das mãos do ordenhador, o que pode facilitar a transmissão de microrganismos de um animal ao outro. Por isto, a saúde do animal é de fundamental importância, principalmente quando se trata de doenças como a mastite (BRITO et al, 2000).

Muitos estudos têm demonstrado uma crescente preocupação de se avaliar as condições higiênico-sanitárias de produtos alimentícios, bem como avaliar seus aspectos microbiológicos, visto que muitas espécies de *Staphylococcus* são capazes de produzir alguns tipos de enzimas que podem contribuir para a sua virulência, tais como: catalase, coagulase, Dnase, lipase, penicilinase, protease e termonuclease (ASSUMP-

ÇÃO et al, 2003; FORSYTHE, 2002; GONZALES et al, 1997; NISENGARD & NEWMAN, 1997; OTERO et al, 1987).

Autores têm investigado a produção de Desoxirribonuclease (Dnase) por cepas de *Staphylococcus*, isolados de leite, queijo ou outros produtos alimentícios, verificando que um grande número de cepas de *S. aureus* são produtoras desta enzima (VIEIRA-DA-MOTA et al, 2001; NG & TAY, 1993). Nesta pesquisa verificou-se que *S. aureus* foi a espécie que apresentou um maior percentual para a produção desta enzima (39,2%), e as que permaneceram como *Staphylococcus* coagulase positivas – SCP (20,3%). Segundo Nisengard & Newman (1997) a Dnase é uma enzima dos *Staphylococcus* utilizada como um indicador de patogenicidade em cepas de *S. aureus* isoladas de animais e de origem humana.

Bactérias pertencentes a este gênero são capazes de produzir pelo menos quatro tipos diferentes de hemolisinas, sendo as principais β, α e γ. Observou-se que o *S. aureus* foi a espécie que apresentou maio-

res percentuais de produção das toxinas hemolíticas estudadas (α, β e γ), seguido das espécies que permaneceram como coagulase positivas. Com exceção do *S. chromogenes*, todas as outras espécies produziram a β-hemólise, sendo esta a mais frequente (Figura II).

Cáceres & Pizarro (1997), analisando amostras do queijo Casar de Cáceres, observaram que das 6 cepas de *S. aureus* isoladas, 5 foram consideradas hemolíticas, juntamente com 1 (uma) espécie de *S. intermedius*.

Em certos casos, a produção desta enzima está relacionada com a produção de enterotoxinas, o que confere uma maior virulência ao patógeno (PEREIRA et al, 1995; HÉBERT & HANCOCK, 1985; BHAKDI et al, 1984). Harshman et al (1992) citam que esta pode ser responsável por necrose de tecidos, disfunções cardíacas e isquemias e Caiazza & O'Toole (2003) relatam que a produção de biofilmes por cepas de *Staphylococcus* spp. também pode estar relacionada com a produção de hemolisinas. Sabe-se que os biofilmes conferem a estes mi-

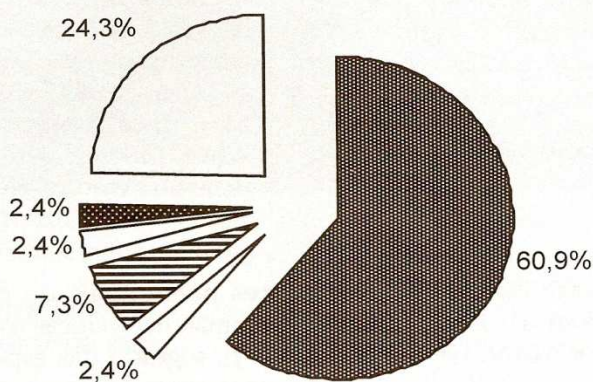
Tabela 1. Frequência de *Staphylococcus spp.* isoladas de leite mastítico e queijo minas frescal, produtoras da enzima Lipase analisada em meio ágar nutriente (5%).

Espécies	<i>S. aureus</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. delphini</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. aureus*</i>	<i>S. schleiferi*</i>	SCP
Frequência (%)	51,4	1,8	9,2	1,8	11,1	1,8	1,8	20,3

*S. aureus** - *S. aureus subsp. anaerobius*

*S. schleiferi** - *S. schleiferi subsp. coagulans*

Figura III – Perfil em percentual de cepas de *Staphylococcus spp.*, produtoras de Penicilinase isoladas de leite mastíticos e de queijo minas frescal.



crorganismos uma maior resistência a antimicrobianos.

Lipases e proteases são freqüentemente encontradas em *Staphylococcus* envolvidos em infecções como carbúnculos e furúnculos, no caso das lipases e alguns tipos de doenças de pele, como dermatite atópica no caso das proteases. A produção destas enzimas em grande quantidade está associada ao aumento da virulência do *S. aureus* principalmente (MIEDZOBRODZKI et al, 2002; KONEMAN et al, 1997; MARTH & HALPIN-DOHNALEK ; 1990).

Enzimas proteolíticas e lipolíticas podem ser uma das maiores causas na deterioração de alimentos, já que as lipases bacterianas sobrevivem a temperaturas de pasteurização, e no caso de queijos as ações destas enzimas podem ocasionar

modificações em seus padrões organolépticos (BRAUN et al , 2000; BRAUN et al, 1999; SABLÉ et al, 1997). Por outro lado, estudos demonstram que a lipase pode ter aplicação industrial, justamente afim de melhorar algumas características dos alimentos tais como textura, sabor e odor (TALON et al, 1996).

Sablé et al (1997), em estudo com queijos fabricados a partir de leite cru de cabras, verificaram que a produção de lipases e proteases por *Staphylococcus* e *Micrococcus* ocasionaram algumas modificações organolépticas (textura e sabor) nas amostras deste tipo de queijo. Assim, torna-se importante a análise destas enzimas em microrganismos detectados em alimentos.

Neste estudo, as únicas espécies que não produziram protease foram *S. hyicus* e os SCP. Dentre as

espécies produtoras desta enzima, o *S. aureus* teve o maior percentual (50%).

Todas as espécies analisadas apresentaram atividades lipolíticas, sendo o *S. aureus* o que obteve um maior percentual para a produção desta enzima (51,8 %) (Tabela 1). Este resultado está em concordância com Braun et al, (2000), que analisando a atividade lipolítica de diferentes espécies de microrganismos, observaram que dentre as espécies estudadas (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens*) a que obteve maiores percentuais foi *S. aureus*, com 51,8%.

Halpin-Dohnalek & Marth (1990) e Canepari et al (1985), constataram a presença de lipase não só em cepas de *S. aureus* mas também em *S. intermedius*, *S. simulans* e *S. hyicus*.

A penicilinase, enzima que se liga a penicilina, dando à célula bacteriana a resistência a este antimicrobiano, tem causado grandes preocupações a médicos e pesquisadores. A resistência de *S. aureus* à Penicilina propagou-se entre os hospitais, tendo se tornado assim um grande problema do ponto de vista clínico e econômico, já que bactérias resistentes a este antibiótico são combatidas com a vancomicina, um antibiótico de administração difícil e custo elevado (NISENGARD & NEWMAN, 1994).

Com exceção de *S. delphini* e da espécie coagulase negativa *S. chro-*

mogenes, as demais espécies foram consideradas positivas para a produção desta enzima, sendo o *S. aureus* o maior produtor com um percentual de 60,9%, seguido das espécies que permaneceram como SCP (Figura III). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Canepari *et al* (1996), que isolaram a penicilinase tanto de cepas de *S. aureus* como de *S. intermedius*, *S. simulans* e *S. hyicus*.

Estudos a respeito desta enzima são de extrema importância, visto a resistência que *S. aureus* e outras espécies deste gênero têm à penicilina (LIMA *et al*, 1999). Segundo Schaechter *et al* (2002), em 1992 verificou-se uma porcentagem de 32% de cepas de *S. aureus* e 75% de *S. epidermidis*, em hospitais dos Estados Unidos, resistentes a este antibiótico.

A resistência à penicilina pode ser devido ao uso indiscriminado

deste antibiótico, utilizado também em muitas fazendas produtoras de leite, seja para o tratamento da mastite como para suplementação dietética dos animais (NASCIMENTO *et al*, 2003). De acordo com White & McDermott (2001), existe a possibilidade de que os antimicrobianos utilizados em animais de produção possam selecionar cepas resistentes de microrganismos que podem ser transmitidos ao homem pela ingestão de produtos de origem animal. Portanto, a presença de microrganismos resistentes a antibióticos em produtos lácteos representa um risco à saúde pública principalmente no nicho de mercado de produtos comercializados sem qualquer tratamento térmico ou controle laboratorial.

A Termonuclease (TNase) é uma enzima produzida por 99% dos SCP, sendo usada como um indicador para a detecção de *S. aureus* em ali-

mentos (visto que a maioria das cepas patogênicas produz a TNase) (NISENGARD; NEWMAN, 1994; JONES *et al*, 1990).

Muitos pesquisadores da área de análise microbiológica de alimentos têm voltado suas atenções para a produção desta enzima por certas espécies de microrganismos, principalmente os pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, pois muitos estudos demonstram uma relação entre a produção de enterotoxinas com a produção de diversas enzimas, tais como a coagulase, hemolisina e principalmente Tnase, já que a ingestão de toxinas presentes no alimento pode ser responsável por intoxicações alimentares (VIEIRA-DAMOTA, 2001; HARVEY & GILMOUR, 1988; BAUTISTA *et al*, 1987; RAYMAN *et al*, 1975; SPERBER & TATINI, 1975).

Neste trabalho, foi constatado um índice de 50% de produção de TNase pelas cepas de *S. aureus* (Figura IV). Gelli *et al*, 1986 e Pereira *et al* (1991) em pesquisas com alimentos envolvidos em intoxicação alimentar e com cepas isoladas de queijo minas frescal, respectivamente, verificaram a relação entre produção de enterotoxina e de termonuclease.

Jasper *et al*. (1985) verificaram que 99,5% dos *S. aureus* isolados de leite de vacas com mastite produziram TNase. Freitas & Magalhães (1990) encontraram um índice de 91,4% de cepas deste patógeno produtoras desta enzima, em amostras

Figura IV – Percentual relacionado à produção de Termonuclease pelas espécies de *Staphylococcus* isoladas de leite mastíticos e queijo minas frescal.

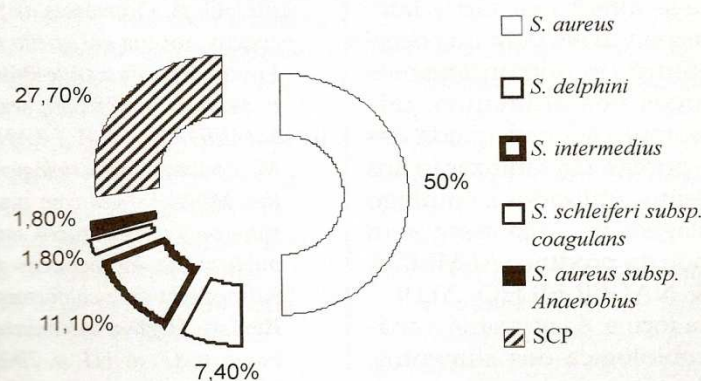


Tabela 2 – Frequência e classificação de *S. aureus* e SCP quanto ao seu biótipo de origem e tipo de alimento analisado.

Espécies	Total	Amostras		Biótipos	
		Leite	Queijo	Bovino	Canino
<i>S. aureus</i>	30	11	19	28	02
SCP	16	01	15	16	0

de leite pasteurizado tipo C. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al (2000) que, analisando cepas de *S. aureus* isolados de leite mastítico, constataram que 97,8% eram produtoras de Term nuclease.

Outros estudos detectaram a presença não só de *S. aureus*, como também de outras espécies pertencentes a este gênero, produtoras desta enzima (CUNHA NETO et al, 2002; SILVA et al, 2000). Neste estudo, além do *S. aureus*, as espécies *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e as que permaneceram como SCP, também foram produtoras de term nuclease (Figura IV).

Estes dados são preocupantes, tanto em Saúde Pública quanto em Medicina Veterinária, uma vez que o leite, estando contaminado por microrganismos produtores de enzimas termoestáveis, coloca em risco a saúde dos consumidores de produtos lácteos, além de conferir uma maior capacidade dos patógenos em causarem danos à saúde do animal (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001; BRITO, 2000).

O *S. aureus* e outros *Staphylococcus* coagulase positiva, são os microrganismos mais comuns envolvidos em infecções e intoxicações, sendo na maioria das vezes detectados no leite cru. Assim, é de suma importância averiguar a origem primária destas cepas, pois este tipo de informação serve como subsídio ao conhecimento da epidemiologia bem como auxílio no controle da doença (BRITO et al, 2000).

Uma população de *S. aureus* pode ser originária de diferentes animais e apresentar ecovariedades distintas, que podem ser classificadas em biótipos humano, bovino, aviário ou canino. Neste trabalho, *S. aureus* e as espécies que permaneceram como *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) foram submetidas ao teste de Cristal Violeta para averiguar a origem destas cepas. Veri-

ficou-se que, das 30 cepas de *S. aureus*, somente 2 cepas foram de origem canina, estas isoladas de queijo, sendo que as restantes foram classificadas como biótipo bovino juntamente com todas as cepas SCP (Tabela 2).

Pesquisadores brasileiros realizando a biotipagem da origem do *S. aureus* isolados de leite com mastite nas regiões sul, sudeste e nordeste, verificaram a presença de cepas de biótipo bovino, humano, aviário e ovino, com predomínio de ecovares bovinos (BRITO et al, 2000; LANGE et al, 1997). Essa elevada ocorrência de ecovares bovinos também foi apresentada pelas cepas analisadas neste estudo. Diferindo dos dados acima citados, detectamos também biótipo canino.

Este número de biótipo canino nas amostras de queijo poderia ser atribuído a falhas durante o processo de ordenha ou beneficiamento do leite, como por exemplo uma má higienização por parte do manipulador, ou mesmo pela presença de cães, seja no local da ordenha ou no local de fabricação do queijo.

Pode-se inferir que vários fatores são responsáveis para que ocorra a presença de microrganismos patogênicos nos alimentos, tais como manipulação inadequada das matérias-primas, má sanitização dos equipamentos utilizados e emprego de embalagens que não assegurem a qualidade do produto (ALMEIDA FILHO & NADER FILHO, 2000)

Desta forma, é necessária a análise microbiológica dos alimentos, principalmente aqueles que são intensamente manipulados, pois os danos causados a estes implicam tanto em prejuízo financeiro ao produtor como em risco à saúde das pessoas que consomem estes alimentos contaminados.

CONCLUSÕES

▲ Das 70 cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de

queijo minas frescal e leite de vacas com mastite, submetidas a provas bioquímicas, foram identificadas as seguintes espécies: *S. aureus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e a espécie coagulase negativa *S. chromogenes* ;

▲ Dentre as espécies identificadas através dos testes bioquímicos, o *S. aureus* foi a que predominou com um total de 36 cepas e apresentou resultados positivos para a produção de todas as enzimas analisadas.

▲ As espécies que apresentaram percentuais maiores para a produção de Term nuclease, foram *S. aureus* (50%) e as que permaneceram como coagulase positivas, 27,7%.

▲ São necessárias análises microbiológicas dos alimentos a fim de averiguar suas condições higiênic-sanitárias, já que a contaminação dos mesmos pode acarretar problemas ligados à Saúde Pública.

REFERÊNCIAS

- 01- ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo Frescal. *Rev. de Saúde Pública, SP*. v. 34, n. 6, p. 578-580, dez., 2000.
- 02- ALMEIDA, P. M. P.; FRANCO, R. M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas Frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* e *coliformes fecais*. *Revista Higiene Alimentar, São Paulo*, v. 17, n. 111. p. 79-85. ago. 2003.
- 03- ASSUMPÇÃO, E. G.; PICOLIVALLE, R. H.; HIRSCH, D.; ABREU, L. R. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 3, p. 366-370, jun. 2003.
- 04 - BAUTISTA, L.; PILAR, G.; MÊDINA, M.; NUÑEZ, M. A quantitative study of enterotoxin production

- by sheep milk Staphylococci. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 566-569, feb. 1988.
- 05- BHAKDI, S.; MUHLY, M.; FÜSSLE, R. Correlation between toxin binding and hemolytic activity in membrane damage by staphylococcal α - toxin. **Infection and Immunity**, v.46, n.2, p. 318-323, nov. 1984.
- 06- BECKER, K. et al. Enterotoxigenic potential of Staphylococcus intermedius. **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v.67, n.12, p. 5551-5557, dec. 2001.
- 07- BRASIL. **Regulamentos Téc. de Identidade e Qual. de Leite e Produtos Lácteos**. Min. da Agric. e do Abastecimento/ Secr. de Defesa Agropecuária/ Depto. de Inspeção de Prods. de Origem Animal. Brasília – DF, 1997.
- 08- BRAUN, P.; BALZER, G.; FEHLHABER, K. Activity of bacterial lipases at chilling temperatures. **Food Microbiology**, v. 18, p. 211-215.2001.09- BRAUN, P.; FEHLHABER, K.; KLUG, C.; KOOP, R. Investigations into the activity of enzymes produced by spoilage-causing bacteria: a possible basis for improved shelf-life estimation. **Food Microbiology**, v. 16, p. 531-540, oct. 1999.
- 10- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; CORDEIRO, F. M.; COSTA, W. A.; FORTES, T. O. Caracterização de biótipos de Staphylococcus aureus isolados de mastite bovina. **Arq. Bras. de Med. Veter. e Zootecnia**, B.H., v. 52, n. 5, p. 425-429, out. 2000.
- 11- CÁCERES, P.; CASTILLO, D.; PIZARRO, M. Secondary flora of Casar de Cáceres cheese: Characterization of Micococcaceae. **Int. Dairy Journal**, Great Britain, v. 7, p. 531-536, jul.1997.
- 12- CALAZZA, N. C.; O'TOLLE, G. A. Alpha toxin is required for biofilm formation by Staphylococcus aureus. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 10, p. 3214-2317, may. 2003.
- 13- CANEPARI, P.; VARALDO, P. E.; FONTANA, R.; SATTI, G. Different Staphylococcal species contain various numbers of Penicillin-binding proteins ranging from four (Staphylococcus aureus) to only one (Staphylococcus hycus). **Journal of Bacteriology**, v. 163, n. 2, p. 796-798, aug. 1985.
- 14- CETIN, E. T. Hemolysin-inhibiting substance in Staphylococcus aureus strains. **Journal Bacteriology**, v.86, p. 407-413, mar. 1963.
- 15- COELHO, D. T.; ROCHA, A. A. **Práticas de Processamento de Prod. de Origem Animal**. Ed. Gráfica da Universidade Federal de Viçosa. – MG, Brasil, p. 36-37, 1981.
- 16- CUNHA NETO, A. SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. Staphylococcus enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.22, n.3, p. 263-271, dez. 2002.
- 17- FAGUNDES, H., OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por Staphylococcus aureus e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p. 1315-1320, jul/ago. 2004.
- 18- FENIMAN, C. M.; MUCELIN, C. A. Avaliação Microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado no município de Medianeira – PR. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104/105. p. 77-86, jan./fev. 2003.
- 19- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Editora Artmed, Porto Alegre – RS, 2002.
- 20- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Editora Attheneu, São Paulo, 1996.
- 21- FREITAS, M. A. Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de Staphylococcus aureus isolados de vacas com mastite. **Rev. de Microbiologia**, SP -, v. 21, n. 4, p.315-319, 1990.
- 22- GELLI, D. S.; MARTINS, M. C. Staphylococcus aureus produtor de Termonuclease em alimentos. **Rev. Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 46, n. 1/ 2, p. 103-109, 1986.
- 23- GONZALES, A. G. M.; MONTEIRO, M. F. F.; OLIVEIRA, C. A. G. **Rev. Higiene Alimentar**. SP, v. 11, n. 51, p.33-35, 1997.
- 24- HARSHMAN, S.; LEFFERTS, P. L.; SNAPPER, J R. Staphylococcal alpha toxin: a study with chronically instrumental awake sheep. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 09, p. 3489-3496, sept. 1992.
- 25- HARVEY, J.; GILMOUR, A. Isolation and characterizadtion of staphylococci from goats milk produced in Northern Ireland. **Letters in Applied Microbiology**, v. 7, p. 79-82, 1988.
- 26- HÉBERT, G. A.; HANCOCK, G. A. Synergistic hemolysis exhibited by species of Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 22, n. 3, p. 409-415, sept. 1985.
- 27- ISEPON, J. S.; SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados na cidade de Ilha Solteira – SP. **Rev. Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 106, p. 89-94, mar. 2003.
- 28- JASPER, D. E.; INFANTE, F.; DELLINGER, J. D. Relationships among the results of coagulase, staphylococcal toxin, and thermonuclease tests on Staphylococci from cow milk. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 21, n. 4, p. 582-584, 1985.
- 29- JONES, D.; BOARD, R. G.; SUSSMAN, M. **Staphylococci**. USA, 1990.
- 30- KLOSS, W. E. Systematics and the natural history of Staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, Washington, 1990.
- 31- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diag. microbiológico**. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 5ª ed., 1997.
- 32- LACHICA, R. V. F.; GENIGEORGIS, C. & HOEPRICH, P. D. Metachro-

- matic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Applied Microbiology*, USA, v.21, n.4, p. 5 85-587, apr.1971.
- 33- LEITÃO, M. F. F.; HAGLER, L. C. S. M.; HAGLER, A. L. & MENEZES, T. S. B. *Tratado de Microbiologia*. Editora Manole, São Paulo-SP, 1988.
- 34- LIMA, T. C. S.; GRISI, B. M.; BONATO, M. C. M. Bacteria isolated from a sugar cane agro-ecosystem: their potential production of a polyhydroxyalcanoates and resistance to antibiotics. *Revista de Microbiologia*, v. 30, n. 3, p. 214-224, jul.1999.
- 35- LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, dez. 2001.
- 36- Mac FADDIN, J. F. *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Edit. Panamericana, Buenos Aires, 1976.
- 37- MARTH, E. H.; HALPIN-DOHNALEK, M. I. Characterization of strains of *Staphylococcus aureus* by their lipolytic activity on various agar media. *Journal of Food Science*. v.55, n.2, 1990.
- 38- MIEDZOBRODZKI, J.; KASZYCKI, P.; BIALECKA, A. & KASPROWICZ, A. Proteolytic activity of *Staphylococcus aureus* strain isolated from the colonized skin of patients with acute-phase Atopic Dermatitis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, v.21, p. 269-276, apr. 2002.
- 39- NASCIMENTO, G.G.F., MAESTRO, V., CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. *Revista de Nutrição*, Campinas, v.14, n.2, p. 119-124, maio/ago.2001.
- 40- NG, D. L. K.; TAY, L. Enterotoxigenic strains of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in drinks and ready-to-eats foods. *Food Microbiology*. v. 10, p. 317-320, nov. 1993
- 41- NISENGARD & NEWMAN. *Microbiologia oral e Imunologia*. Ed. Guanabara Koogan, 2ª edição, Rio de Janeiro, 1997.
- 42- OTERO, A.; GARCIA, M. C.; PRIETO, M.; MORENO, B. Behavior of *Staphylococcus aureus* strains, producers of enterotoxins C₁ or C₂, during the manufacture and storage of Burgos cheese. *Journal of Applied Bacteriology*, Washington, v. 64, p.117-122, 1987.
- 43- PARAJE, R. & PARAJE, A R. *Microbiologia Clínica*. Editorial Medica Panamericana, 2ª ed., Buenos Aires, 1976.
- 44- PEREIRA, M. A.; do CARMO, L. S.; dos SANTOS, E. J.; SELLOS, I. T.; BERGDOLL, M. S. *Staphylococci in breast milk from women with and without mastitis*. *Rev. Microbiologia*, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 117-120, 1995.
- 45- PEREIRA, M. L.; LARA, M. A.; DIAS, R. S.; CARMO, L. S. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo "tipo minas". *Revista de Microbiologia*, S.P., v. 22, n. 4., p. 349-350, 1991.
- 46- PINTO, E. S. *Quantificação de Staphylococcus aureus em cortes de frango comercializados no município de Cuiabá – MT*. 1999 (Monografia de Especialização em Nutrição) – Fac. de Ciências Médicas – Univ. Fed. de Mato Grosso, Cuiabá.
- 47- RAYMAN, M. K.; PARK, C. E.; PHILPOTT, J.; TOOD, C. D. Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as means of identifying *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology*, USA, v. 24, n.4, p. 41-454, apr. 1975.
- 48- ROBERSON, J.R. et al. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. *American Journal of Veterinary Research*, USA, v.57, n.1, p. 54-58, jan. 1996.
- 49- SÁ, M.E.P. et al. Etiologia da mastite subclínica em bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, Niteroi, v.7, n.2, p. 100-103, maio/ago. 2000.
- 50- SABLÉ, S.; PORTRAIT, V.; GAUTIER, V.; LETELLIER, F.; COTTENCEAU, G. Microbiological changes in a soft raw goat's milk cheese during ripening. *Enzyme and microbial Technology*, v. 21, p. 212-220, 1997.
- 51- SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. *Microbiologia – mecanismo das doenças infecciosas*. Ed. Guanabara Koogan, 3ª edição, Rio de Janeiro - RJ, 2002.
- 52- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. Livraria Varela; São Paulo – SP, 1997.
- 53- SILVA, W. P.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of brazilian dairy farms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, n.2 p. 103-106, jun.. 2000.
- 54- SPERBER, W. H.; TATINI, S. R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology*, v. 29, n. 4, p. 502-505, 1975.
- 55- TALON, R.; MONTEL, M. C.; BERDAGUE, M. C. Production of flavour esters by lipases of *S. Warnieri* and *s. Xylosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 19, p. 620-622, 1996.
- 56- VIEIRA-DA-MOTTA, O.; FOLLY, M. M.; SAHYIAMA, C. C. H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 27-31, mar. 2001.
- 57- WHITE, D.G.; MCDERMOTT, P.F. Emergence and Transfer of Antibacterial Resistance. *Journal of Dairy Science*, USA, v. 84(E. Suppl.), p. E151-E155, 2001. ❖