

**STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM LEITE CRU. I. CONTAGEM, VERIFICAÇÃO DA ENTEROTOXIGENICIDADE E FAGOTIPAGEM DAS CEPAS ISOLADAS**

WANDERLEY PEREIRA DE ARAUJO  
Professor Doutor  
Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia da USP

SEBASTIÃO TIMO IARIA  
Professor Titular  
Instituto de Ciências Biomédicas da USP

GIL VIANNA PAIM  
Professor Doutor  
Faculdade de Saúde Pública da USP

CARLOS SOLE-VERNIN  
Professor Titular  
Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto-USP

ARAUJO, W.P.; IARIA, S.T.; PAIM, G.V.; SOLE-VERNIN, C.  
*Staphylococcus aureus* em leite cru. I. Contagem, verificação da enterotoxigenicidade e fagotipagem das cepas isoladas. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 26(2):187-198, 1989.

**RESUMO:** Foram analisadas 100 amostras de leite cru, obtidas na plataforma de recepção da Usina de Pasteurização do Centro Intraunidade de Zootecnia e Indústrias Pecuárias (CIZIP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado no Município de Pirassununga, SP. A partir de cada amostra realizou-se a contagem de *S. aureus*, em ágar Baird-Parker a 37 °C por 24-48 horas, sendo as cepas isoladas identificadas através da verificação microscópica da morfologia e das provas de produção de catalase, de fermentação/oxidação de glicose e da produção de coagulase e termonuclease. Das amostras analisadas, 50 revelaram-se positivas para *S. aureus*, com contagens que variaram de 30 a 110.000/ml de leite. Das amostras positivas foram isoladas 201 cepas, as quais foram submetidas à verificação da capacidade produtora de enterotoxina estafilocócica, empregando-se um método de cultura em saco de celofane. Para a constatação da presença de enterotoxina nos extratos obtidos, usou-se o processo da dupla imunodifusão em gel, em lâminas. Do total de cepas examinado, apenas uma, isolada de uma amostra com 860 *S. aureus* por ml de leite, mostrou-se produtora de enterotoxina do tipo B. A fagotipagem esta cepa foi lisada unicamente pelo fago 53, pertencente ao

Grupo III do Conjunto Básico Internacional Humano e ao Grupo III do Conjunto Básico Bovino.

**UNITERMOS:** *Staphylococcus aureus* ; Leite, microbiologia

**INTRODUÇÃO**

O leite, alimento rico em nutrientes, constitui-se em um excelente meio de cultura para microrganismos, os quais podem ocasionar alterações do produto ou risco aos seus consumidores. Durante e após a ordenha o leite é passível de ser contaminado com microrganismos provenientes da ordenhadeira mecânica, do ar, da água utilizada na limpeza de utensílios, como baldes e latões e, por outro lado, os animais doentes ou portadores, podem veicular ao leite bactérias patogênicas (COMITE MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN HIGIENE DE LA LECHE<sup>14</sup>, 1971).

Dentre as bactérias que se podem encontrar no leite destaque-se o *Staphylococcus aureus*, microrganismo capaz de provocar doenças no homem e nos animais e que, através dos alimentos, pode ser responsabilizado por casos de intoxicação alimentar. A contaminação de utensílios, equipamentos e alimentos por *S. aureus* pode ocorrer a partir de ordenhadores e outros manipuladores infectados (HOOBS & GILBERT<sup>32</sup>, 1978) e, também, de animais (MORRISON et alii<sup>41</sup>, 1961).

Diversos pesquisadores têm evidenciado a presença de *S. aureus* no leite cru ou pasteurizado e/ou seus derivados (FERNANDEZ<sup>22</sup>, 1966; GHOSH & LAXMINARAYANA<sup>26</sup>, 1972; GHOSH & LAXMINARAYANA<sup>27</sup>, 1974; WILSON<sup>58</sup>, 1977; AHMED et alii<sup>1</sup>, 1978; GOMEZ et alii<sup>30</sup>, 1979; CABRAL et alii<sup>10</sup>, 1983).

De forma geral, estando presente em alimentos, o *S. aureus* pode multiplicar-se e atingir números elevados. Entretanto, deve-se considerar que o maior crescimento dessa bactéria no alimento ocorre quando o pH estiver na faixa de 7,0 a 7,5 (BAIRD-PARKER<sup>7</sup>, 1974), a atividade água (aw) entre 0,980 e 0,995 (JAY<sup>35</sup>, 1973) e a temperatura entre 30 e 37 °C (BAIRD-PARKER<sup>7</sup>, 1974). Saliente-se que o leite pode apresentar-se com pH de 6,8 a 7,0 (CORLETT & BROWN<sup>15</sup>, 1980) e com aw de 0,980 (TROLLER & CHRISTIAN<sup>55</sup>, 1978).

Por outro lado, FRAZIER & WESTHOFF<sup>23</sup> (1978) destacam que pode ocorrer produção de enterotoxina na faixa ótima de 21 a 36 °C. Porém referem que quanto mais favorável for o alimento para a multiplicação dessa bactéria, mais amplas são as faixas de temperatura e pH que permitem o seu crescimento. É importante considerar que, em nosso meio, o leite após a ordenha, é frequentemente mantido em temperatura ambiente e,

portanto, em condições não adequadas para a sua conservação.

Diante disto, levando em conta as características acima referidas, aliadas à disponibilidade de nutrientes e à temperatura, o leite permite a multiplicação de *S. aureus*, que pode atingir números elevados e, se for enterotoxigênico, poderá, durante o seu crescimento, produzir enterotoxina estafilocócica.

A intoxicação alimentar estafilocócica ocorre pela ingestão de alimentos contendo enterotoxina produzida por cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas, embora nem todas as cepas sejam enterotoxigênicas (EVANS<sup>20</sup>, 1948 e EVANS et alii<sup>21</sup>, 1950). Os sintomas mais freqüentes, observados nessa intoxicação, ocorrem 1 a 6 horas após a ingestão do alimento e se revelam por sialorréia, náusea, vômito, diarreia e, comumente, hipotermia (DACK<sup>16</sup>, 1964 e FRAZIER & WESTHOFF<sup>23</sup>, 1978). É uma doença de alta morbidade, porém de baixa letalidade (GILBERT<sup>28</sup>, 1974) e os indivíduos acometidos geralmente se recuperam num período de 1 a 3 dias (DACK<sup>16</sup>, 1964).

Com relação a enterotoxina estafilocócica, atualmente são conhecidos 6 tipos sorológicos denominados A, B, C, D, E e F. Os processos de pasteurização e de desidratação destroem a maioria ou todos os estafilococos, mas não inativam a enterotoxina produzida (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS<sup>34</sup>, 1978), já tendo sido relatados alguns surtos de intoxicação alimentar estafilocócica relacionados à ingestão de leite em pó reconstituído que não continha estafilococos viáveis (ANDERSON & STONE<sup>2</sup>, 1955 e ARMIJO et alii<sup>4</sup>, 1957).

Em países como Espanha (FERNANDEZ<sup>22</sup>, 1966), Estados Unidos (CASMAM et alii<sup>12</sup>, 1967), Índia (GHOSH & LAXMINARAYANA<sup>26</sup>, 1972 e KUMAR & GUPTA<sup>37</sup>, 1983), Inglaterra (WIENEKE<sup>56</sup>, 1974), Egito (AHMED et alii<sup>1</sup>, 1978), Japão (KATO & KUME<sup>36</sup>, 1980) e Hungria (LOMBAI et alii<sup>39</sup>, 1980), em amostra de leite e seus derivados, foi demonstrada a presença, em percentagens variáveis, de cepas *S. aureus*, produtoras dos diferentes tipos de enterotoxina estafilocócica.

No Brasil, alguns pesquisadores têm evidenciado a ocorrência de cepas de *S. aureus* produtoras de enterotoxina, isoladas de alimentos como macarrão (DELAZARI & LEITÃO<sup>18</sup>, 1976), linguiça fresca (RUDGE<sup>47</sup>, 1980), doces cremosos (IARIA<sup>33</sup>, 1981), produtos cárneos embutidos (HIROOKA & MULLER<sup>31</sup>, 1982), queijo coalho (CABRAL et alii<sup>10</sup>, 1983), carne moída (CERQUEIRA-CAMPOS & IARIA<sup>13</sup>, 1983). A partir de leite de vacas com mastite evidenciou-se, também, a enterotoxigenicidade das cepas isoladas (SCHOCKEN-ITURRINO et alii<sup>48</sup>, 1986; FURLANETTO et alii<sup>24</sup>, 1987; NADER FILHO et alii<sup>42</sup>, 1988).

Em investigações epidemiológicas de surtos de intoxicação alimentar estafilocócicas WILLIAMS et alii<sup>57</sup>, 1953 referem a utilização da fagotipagem das cepas de

*S. aureus* isoladas dos alimentos envolvidos, tentando-se relacionar o fagótipo com a produção de enterotoxina.

Para tanto, em 1974, estabeleceu-se um Conjunto Básico Internacional de bacteriófagos, ao qual as cepas de estafilococos devem ser submetidas (SOLE-VERNIN<sup>52</sup>, 1976). Embora esse Conjunto de bacteriófagos, utilizado para fagotipagem de cepas de origem humana, possa lisar cepas isoladas de bovinos (BLAIR & WILLIAMS<sup>9</sup>, 1961), alguns autores sugerem, para cepas isoladas de leite, a utilização de um Conjunto de bacteriófagos obtidos de estafilococos de origem bovina (SETO & WILSON<sup>49</sup>, 1958; NAKAGAWA<sup>43</sup>, 1960; DAVIDSON<sup>17</sup>, 1961; MARKHAM & MARKHAM<sup>40</sup>, 1966) a fim de se aumentar o índice de tipificação desses microrganismos.

Na Inglaterra SIMKOVICOVA & GILBERT<sup>51</sup> (1971) e GILBERT & WIENEKE<sup>29</sup> (1973) verificaram que a maioria das cepas de *S. aureus*, isoladas de alimentos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar, eram sensíveis a fagos dos Grupos III ou I/III. ANGELOTTI<sup>3</sup> (1969) e GILBERT<sup>28</sup> (1974) salientam, entretanto, que a produção de enterotoxina não pode ser prevista, simplesmente, a partir dos resultados da fagotipagem.

Do exposto pode-se depreender que, em nosso meio, é necessária a realização de novas investigações sobre a presença e quantidade de *S. aureus* no leite cru, bem como, a verificação da capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas desse alimento e da sensibilidade a bacteriófagos dos Conjuntos Básicos Humano e Bovino.

São objetivos da presente investigação:

- 1-Constatar a presença e o número de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite cru.
- 2-Verificar a capacidade enterotoxigênica das cepas de *S. aureus* isoladas.
- 3-Verificar o comportamento das cepas de *S. aureus* isolados frente às provas de fagotipagem.

#### MATERIAL E MÉTODO

As amostras de leite foram colhidas na plataforma da usina de pasteurização do Centro Intraunidade de Zootecnia e Indústrias Pecuárias (CIZIP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, localizado em Pirassununga, São Paulo.

Em tubos esterelizados, foram colhidas 100 amostras de leite de latões provenientes das 5 linhas de leite existentes, tomando-se o cuidado de colher, no mínimo, uma amostra de cada propriedade.

A partir de cada amostra foi realizada a contagem de *S. aureus*, verificação do comportamento das cepas

isoladas, frente a provas bioquímicas e de fagotipagem, e também, quanto à capacidade enterotoxigênica.

Para cada amostra prepararam-se diluições decimais em solução de água fosfatada esterilizada e com pH 7,2, semeando-se 0,2 ml da amostra de leite e suas diluições em placas de Petri contendo ágar Baird-Parker. As placas eram incubadas a 37 °C por 24 ou 48 horas (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS<sup>34</sup>, 1978), realizando-se, a seguir, a contagem do número de colônias de cor negra, brilhantes, com zona de precipitação ao redor e circundadas por halo claro (BAIRD-PARKER<sup>5</sup>, 1962), nas placas com 30 a 300 colônias. Multiplicando-se o número de colônias por 5 e pelo fator de diluição obtinha-se o número presuntivo de *S. aureus* por mililitro de leite.

Efetua-se, então, o isolamento de 1 a 5 colônias por amostra, a partir da placa de contagem, semeando-se em tubos de ágar simples inclinado, incubados a 37 °C, por 24 horas. Comprovando-se a presença de cultura pura de cocos Gram-positivos, agrupados em forma de cachos, realizava-se a identificação bioquímica das cepas isoladas através das provas de catalase, oxidação-fermentação da glicose, coagulase em plasma de coelho e da termonuclease (BAIRD-PARKER<sup>6</sup>, 1966; SUBCOMMITTEE TAXONOMY OF STAPHYLOCOCCI AND MICROCOCCI<sup>53</sup>, 1965; LACHICA et alii<sup>38</sup>, 1971; ZELANTE<sup>59</sup>, 1974). Após identificação bioquímica, o resultado da contagem presuntiva era confirmado ou corrigido.

A fagotipagem das cepas de *S. aureus* foi realizada na Seção de Fagotipagem do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, por gentileza do Professor Dr. Carlos Solè-Vernin. Para tanto, utilizou-se o Conjunto Básico Internacional para cepas de origem bovina. Para composição desse Conjunto, 7 dos 16 fagos, utilizados exclusivamente para fagotipagem de cepas bovinas, foram cedidos gentilmente pelo Laboratório Veterinário Central do Ministério da Agricultura, Pesca e Alimento da Inglaterra, e os demais fagos pertenciam à coleção de bacteriófagos de Ribeirão Preto.

Os dois Conjuntos de bacteriófagos utilizados para fagotipagem das 201 cepas de *S. aureus* isoladas de leite estão relacionados, a seguir:

CONJUNTO BÁSICO INTERNACIONAL DE BACTERIÓFAGOS PARA FAGOTIPAGEM DE CEPAS DE *S. AUREUS* DE ORIGEM HUMANA.

Grupo	Bacteriófagos
I	29, 52, 52A, 79, 80
II	3A, 3C, 55, 71
III	6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85
Não Classificados	81, 94, 95, 96

CONJUNTO BÁSICO INTERNACIONAL DE BACTERIÓFAGOS PARA FAGOTIPAGEM DE CEPAS DE *S. AUREUS* DE ORIGEM BOVINA.

Grupo	Bacteriófagos
I	29, 52A
II	3A, 116
III	6, 42E, 53, 75, 84
IV	42D, 102, 107, 117
Miscelânea	78, 118, 119

Nas provas de fagotipagem empregou-se a técnica recomendada por BLAIR & WILLIAMS<sup>9</sup> (1961), submetendo-se, inicialmente, as cepas aos diferentes fagos dos 2 Conjuntos na concentração de 1xRTD (Routine Test Dilution) e, quando não reagentes, submetidos a 100xRTD.

O fagótipo de cada cepa era constituído levando-se em consideração, inicialmente, o resultado da fagotipagem a 1xRTD para os dois Conjuntos de bacteriófagos ou, caso não houvesse lise nessa diluição, a 100xRTD.

Quanto à verificação da produção de enterotoxina a partir das cepas de *S. aureus* isoladas, foram utilizadas as enterotoxinas e anti-enterotoxinas padrões A, B, C, D e E, preparadas pelo "Food Research Institute of Wisconsin University", Estados Unidos, e gentilmente fornecidas pelo Professor Merlin S. Bergdoll.

Para a produção de enterotoxina pelas cepas de *S. aureus* isoladas empregou-se a técnica de DONNELLY et alii<sup>19</sup> (1967), modificada por SIMKOVIČOVA & GILBERT<sup>51</sup> (1971), e que consiste na cultura das cepas de *S. aureus* ao redor de um saco de celofane, contendo caldo infusão de cérebro e coração em concentração dupla, colocado no interior de um Erlenmeyer. Após um período de incubação de 48 horas a 37 °C, a suspensão bacteriana era centrifugada por 45 minutos a 4.200 rpm em centrífuga refrigerada, utilizando-se o sobrenadante, que constituía o extrato, para a pesquisa de enterotoxina estafilocócica.

Para se verificar a presença de enterotoxina nos extratos obtidos utilizou-se a técnica de dupla imunodifusão, empregada por SILES VILLARROEL<sup>50</sup> (1972), em lâminas de microscopia. Para tanto as lâminas eram cobertas com 2 camadas de ágar a 1% e, após solidificação do ágar, eram feitas 5 perfurações, uma central e quatro periféricas, sendo cada conjunto de 5 orifícios correspondente à pesquisa de um tipo de enterotoxina.

Na pesquisa de enterotoxina, os 5 orifícios centrais eram preenchidos, respectivamente, com as soluções padrões de anti-enterotoxina estafilocócica A, B, C, D e E. Nos orifícios superior direito e inferior esquerdo colocava-se as soluções padrões de enterotoxina A, B, C, D e E, respectivamente, e os orifícios superior esquerdo e inferior direito dos 5 conjuntos eram preenchidos com o

extrato, no qual se estava pesquisando a presença de enterotoxina.

Após um período de incubação de 24 horas a 37 °C, efetuava-se uma primeira leitura das lâminas. A seguir, após secagem do ágar em estufa a 60 °C, as lâminas eram coradas com uma solução de Amido Schwars 10 B (SILES VILLARROEL<sup>50</sup>, 1972). Realizava-se, então, uma segunda leitura para elucidação de reações duvidosas constatadas na primeira leitura. Considerava-se reação positiva para um determinado tipo de enterotoxina, quando se formava uma linha contínua de precipitação ao redor do orifício central.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tab. 1 encontra-se a distribuição das amostras de leite das 5 linhas existentes em Pirassununga segundo a positividade para *S. aureus*.

Verifica-se na Tab. 1 que das 100 amostras de leite examinadas, 50% apresentaram-se positivas para *S. aureus*, valor que poderia ser maior se tivessem sido empregadas técnicas de enriquecimento, mas, mesmo assim, a taxa de positividade pode ser considerada elevada. Observa-se, ainda, que das 5 linhas de leite, a que forneceu amostras desse produto com menor positividade para *S. aureus* foi a linha *a* (25,0%). Entretanto, tal linha é representada por apenas uma propriedade leiteira de boa qualidade e de alta produção, onde os animais são ordenhados mecanicamente. Com relação a linha *b*, a positividade para *S. aureus* foi elevada, porém essa linha é, também, representada por apenas uma propriedade de baixa produção leiteira, e portanto, o resultado deve ser considerado com reservas.

Por outro lado, as linhas *c, d e e*, cada uma com 20, 17 e 14 propriedades, que através de ordenha manual, produziram no dia da colheita 1332, 1753 e 1906 litros de leite, respectivamente, apresentaram positividade para *S. aureus* de 57,1%, 48,4% e 55,9%, respectivamente, valores também considerados altos.

Porém, WILSON<sup>58</sup> (1977), analisando amostras de leite cru obtidas em duas Companhias de leite da região de Paraibuna, São Paulo, constatou positividade para *S. aureus* de 76,4% e 88,7%, respectivamente, estas, portanto, muito mais elevadas do que as observadas no presente estudo.

Na Tab. 2, estão distribuídas as 53 propriedades das 5 linhas, das quais foram obtidas as amostras de leite, segundo a positividade para *S. aureus*.

Observa-se na Tab. 2 que um número elevado de propriedades leiteiras, ou seja, 36 (67,9%) revelaram-se com amostras de leite positivas para *S. aureus*.

Considerando-se apenas as linhas *c, d e e*, pois as linhas *a e b* eram representadas por apenas uma

propriedade leiteira cada uma, verifica-se que 12 (60,0%), 11 (64,7%) e 11 (78,6%) propriedades, respectivamente, forneceram amostras de leite positivas para *S. aureus*, revelando-se, portanto, um número elevado de propriedades em que esse produto apresentava-se contaminado por essa bactéria.

Esses fatos demonstram que a contaminação do leite, por cepas de *S. aureus*, provenientes de animais, de pessoas que manipulam o produto, de utensílios utilizados, ou ainda do próprio ambiente, é elevada. Isto sugere que as medidas higiênico-sanitárias devem ser aplicadas com mais rigor, a fim de se evitar um elevado grau de contaminação por *S. aureus* e sua multiplicação, para que se possa obter um produto de melhor qualidade.

Na Tab. 3 estão distribuídas, em 7 classes, as 100 amostras de leite, segundo o número de *S. aureus* por mililitro e a positividade para cepas produtoras de enterotoxina estafilocócica.

Das 100 amostras examinadas 50 (50,0%) apresentaram contagens de *S. aureus*, que variaram entre 5 a 5x10 e 10<sup>5</sup> e mais, (30 a 110.000), valores esses relativamente baixos, quando comparados com os obtidos por WILSON<sup>58</sup> (1977) em São Paulo. Esse autor observou que 258 e 149 amostras de leite cru colhidas, respectivamente, em duas usinas da região de Paraibuna, SP, apresentavam contagens médias de *S. aureus*, de 1.878.000 e 780.000 por ml, respectivamente.

É importante salientar que das 50 amostras positivas para *S. aureus*, apenas uma continha 10<sup>5</sup> ou mais dessa bactéria, valor esse tido como limite, a partir do qual o alimento pode causar intoxicação alimentar estafilocócica. Para isto, obviamente, deve ocorrer a multiplicação de *S. aureus* produtor de enterotoxina no alimento.

A este respeito, PETERSON et alii<sup>45</sup> (1962) consideram que para causar intoxicação alimentar, o alimento deve contar de 10<sup>6</sup> a 10<sup>9</sup> *S. aureus* por grama ou mililitro. GILBERT<sup>28</sup> (1974) refere 53 surtos dessa doença, cujos alimentos associados, revelaram-se com contagens de *S. aureus* de 1,2 x 10<sup>5</sup> a 10<sup>9</sup> ou mais por grama.

A contagem alta de *S. aureus* enterotoxigênico no alimento é importante porque, para causar intoxicação alimentar deve ocorrer a produção de enterotoxina em quantidades capazes de promover o surgimento de sintomas de intoxicação. CASMAN & BENNETT<sup>11</sup> (1965) e ANGELOTTI<sup>3</sup> (1969) consideram que essas quantidades devam ser de 1 a 4 µg e 1 a 5 µg, respectivamente. Porém, BERGDOLL<sup>8</sup> (1973) ressalta que a ingestão de quantidades de enterotoxina até inferiores a 1 µg podem determinar o surgimento de sintomas.

Com relação ao leite, alguns pesquisadores em outros países, demonstraram percentagens variáveis de isolamento de cepas de *S. aureus*, produtoras de enterotoxina.

Na Espanha, em amostras de leite cru, FERNANDEZ<sup>22</sup> (1966) verificou que de 18 cepas de estafilococos coagulase-positivos, 5 eram produtoras de enterotoxina estafilocócica. Outros pesquisadores, como CASHMAN et alii<sup>12</sup> (1967) nos Estados Unidos, GHOSH & LAXMINARAYANA<sup>26</sup> (1972) e KUMAR & GUPTA<sup>37</sup> (1983) na Índia, WIENEKE<sup>56</sup> (1974) na Inglaterra, evidenciaram cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas isoladas a partir de leite cru, em percentagens de 10,0%, 7,0%, 23,3% e 6,0%, respectivamente. Nessas pesquisas as enterotoxinas estafilocócicas produzidas, demonstradas pelos autores citados, foram dos tipos A, B, C, D e da associação dos tipos AB, BD e CD.

Por outro lado, na Hungria, LOMBAL et alii<sup>39</sup> (1980), em 101 cepas de *S. aureus* isoladas de leite, salientam que nenhuma cepa isolada de vacas assintomáticas para mastite, revelou-se produtora de enterotoxina, ao passo que 4 cepas, isoladas de leite de vacas com mastite, produziram enterotoxina do tipo C.

Com relação a cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas, isoladas a partir de leite de vacas com mastite, as percentagens evidenciadas por diferentes autores, como CASHMAN et alii<sup>12</sup> (1967); OLSON et alii<sup>44</sup> (1970); GARCIA et alii<sup>25</sup> (1980); TAKESHIGE et alii<sup>54</sup> (1983), foram de 2,0%, 14,6%, 7,0% e 33,3%, respectivamente. No Brasil, SCHOCKEN-ITURRINO et alii<sup>48</sup> (1986); FURLANETTO et alii<sup>24</sup> (1987); NADER FILHO et alii<sup>42</sup> (1988) verificaram percentagens de 15,79%, 8,0% e 1,3%, respectivamente, para cepas isoladas de vacas com mastite.

No Japão, KATO & KUME<sup>36</sup> (1980) observaram que de 1056 cepas de *S. aureus*, isoladas de vacas que reagiram positivamente ao "California Mastitis Test" (CMT), 363 (34,3%) produziram enterotoxina dos tipos A, B, C ou D, sendo a maioria, ou seja, 197 (54,3%) produtoras do tipo C, isoladamente ou em associação com outros tipos.

Na presente investigação, analisando-se a Tab. 3 observa-se que apenas de uma (1,0%) amostra de leite obteve-se o isolamento de *S. aureus* produtor de enterotoxina do tipo B, proporção essa inferior às obtidas nos estudos realizados pelos autores referidos. Cumpre salientar que essa amostra continha entre  $10^2$  e  $10^3$  *S. aureus* por ml de leite e, mais especificamente, 860/ml. Dessa amostra, foram isoladas 5 cepas dessa bactéria, das quais apenas uma revelou-se produtora de enterotoxina. Admitindo-se que as 5 cepas isoladas representavam o total de colônias da placa de contagem, dos 860 *S. aureus*/ml de leite, 172/ml poderiam ser considerados enterotoxigênicos, não se evidenciando, portanto, significado epidemiológico imediato em relação à possibilidade de ocasionar intoxicação alimentar estafilocócica.

Quanto à fagotipagem realizada com o Conjunto Básico Humano, verifica-se pela Tab. 4, que das 201 cepas de *S. aureus* testadas, 68 (33,8%) foram lisadas por fagos do Grupo III e 32 (15,9%) dos Grupos III e NC, em

associação, resultados semelhantes aos obtidos por RAHMAN & BAXI<sup>46</sup> (1983), em amostras de leite de vacas com mastite, na Índia.

Por outro lado, com relação à fagotipagem efetuada com o Conjunto Básico Bovino, pode-se constatar na Tab. 5 que houve predominância de cepas lisáveis por fagos dos Grupos III (16,9%) e IV (17,4%) isoladamente e em associação (12,4%). Estes resultados concordam com os verificados por GARCIA et alii<sup>25</sup> (1980), em estudo realizado com 57 cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite, na Espanha.

No presente estudo, as 68 cepas sensíveis, exclusivamente, a fagos do Grupo III e as 32 dos Grupos III/NC em associação, pertencentes ao Conjunto Básico Internacional Humano, foram isoladas de 31 (62,0%) e 22 (44,0%) amostras de leite positivas para *S. aureus*, provenientes de 26 (72,2%) e 20 (55,6%) propriedades, respectivamente (Tab. 4).

De outra parte, as 34 (16,9%) cepas que foram lisadas somente por fagos do Grupo III, as 35 (17,4%) unicamente do Grupo IV e as 25 (12,4%) sensíveis a fagos dos Grupos III e IV em associação, pertencentes ao Conjunto Básico Internacional Bovino, foram isoladas de 18 (36,0%), 14 (28,0%) e 15 (30,0%) amostras positivas para *S. aureus*, oriundas de 17 (47,2%), 13 (36,1%) e 14 (38,9%) propriedades positivas, respectivamente (Tab. 5).

Estes resultados mostram que houve um predomínio de cepas lisáveis por fagos dos Grupos III e III/NC do Conjunto Básico Humano e por fagos dos Grupos III, IV e III/IV do Conjunto Básico Bovino.

Entretanto, deve ser salientado que 35 (17,4%) cepas isoladas de 19 (38,0%) amostras de leite positivas para *S. aureus*, mostraram-se não tipáveis frente aos fagos do Conjunto Básico Humano (Tab. 4). O mesmo ocorreu com relação a 23 (11,4%) cepas isoladas de 13 (26,0%) amostras positivas para aquela bactéria, frente ao Conjunto Básico Bovino (Tab. 5).

Como já foi referido, das amostras de leite analisadas, isolou-se apenas 1 (1,0%) cepa enterotoxigênica. Tal cepa mostrou-se sensível ao fago 53, comum aos Grupos III dos Conjuntos Básico Humano e Bovino.

Tendo em vista os resultados obtidos na presente investigação, novos estudos devem ser realizados a respeito, fazendo-se necessária, também, a adoção de medidas higiênico-sanitárias, nem sempre fáceis de serem aplicadas, visando a obtenção de leite com melhor qualidade bacteriológica, a fim de se reduzir, ao máximo, a contaminação desse produto por *S. aureus*.

Tais medidas devem incluir educação sanitária de manipuladores do leite, como ordenhadores e pessoal responsável pelo transporte desse alimento à usina. Devem ser observados cuidados especiais na limpeza dos utensílios utilizados na ordenha e no transporte do leite, bem como, no resfriamento e transporte rápido à

usina. Também são desejáveis medidas higiênicas relacionadas aos rebanhos leiteiros, a fim de se reduzir a contaminação do leite, tais como, controle da mastite, limpeza e assepsia do úbere e tetas antes da ordenha, evitando-se incluir vacas com mastite, as quais deverão ser ordenhadas a parte e tratadas adequadamente.

### CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e a discussão desenvolvida no presente estudo, esperamos ter contribuído com algumas informações de interesse, que podem ser resumidas nas seguintes conclusões:

- 01-Das amostras de leite cru, obtidas na plataforma de recepção da Usina do Centro Intraunidade de Zootecnia e Indústrias Pecuárias (CIZIP) de Pirassununga, SP, a partir de latões oriundos de 53 propriedades que compunham as 5 linhas de leite existentes, 50 (50,0%) revelaram-se positivas para *S. aureus*, taxa esta que pode ser considerada alta.
- 02-Das 53 propriedades, 36 (67,9%) revelaram-se com amostras de leite positivas para *S. aureus*, sendo observada uma grande variação do número dessa bactéria, ou seja, de 30 a 110.000 por mililitro.
- 03-Apenas de uma (1,0%) amostra de leite, contendo 860 *S. aureus*/ml, isolou-se uma cepa enterotoxigênica desta bactéria, a qual era produtora de enterotoxina do tipo B. Esta cepa era sensível somente ao fago 53, dos Conjuntos Básicos Internacionais Humano e Bovino.
- 04-Um elevado número de cepas de *S. aureus* isolados, foi lisado tanto por fagos do Conjunto Básico Internacional para cepas de origem humana como do Conjunto Básico Internacional para cepas de origem bovina, não sendo típicos 35 (17,4%) e 23 (11,4%) cepas, frente aos dois conjuntos de fagos, respectivamente.
- 05-Das cepas estudadas, houve predominância das lisáveis por fagos dos Grupos III isoladamente (33,8%), e dos Grupos III/MC em associação (15,9%), frente ao Conjunto Básico Humano. Por outro lado, com o Conjunto

Básico Bovino, observou-se maior frequência de cepas sensíveis a fagos dos Grupos III (16,9%), IV (17,4%) e III/IV, em associação (12,4%).

ARAUJO, W.P.; IARIA, S.T.; PAIM, G.V.; SOLE-VERNIN, C. *Staphylococcus aureus* in raw milk. Bacterial counts, enterotoxin production and phage-typing of the isolates. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 26(2):187-198, 1989.

**SUMMARY:** The presence of *S. aureus* and its enterotoxin was investigated in 100 samples of raw milk, collected at the reception platform of a milk pasteurization plant located in Pirassununga, São Paulo, Brazil. All samples were submitted to Baird-Parker agar and positive samples were counted and tested for catalase, fermentation and oxidation of glucose, coagulase in rabbit plasma and for thermonuclease activity. A total of 201 *S. aureus* isolates were isolated from 50/100 (50.0%) of the samples studied, the counts varied from 30 to 110.000 bacteria per ml of milk. The enterotoxigenic capacity of the isolates was verified according to the celophane sac culture method and the detection of the enterotoxins A, B, C, D and E was by means of the double gel immunodiffusion slide test, using the supernatant fluid extract obtained from the staphylococcal growths. Production of enterotoxin was demonstrated in one strain isolated from a sample that showed a count of 860 bacteria/ml and its enterotoxin belonged to type B. The enterotoxigenic strain was susceptible to the phage 53, a phage type common to human and bovine set.

**UNITERMS:** *Staphylococcus aureus*; Milk microbiology

TABELA 1 — Distribuição das amostras de leite segundo as suas linhas de origem e a positividade (N e %) para *S. aureus*. Pirassununga, SP, 1981.

Linha de Leite	a		b		c		d		e		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Amostras de leite												
isolamento de <i>S. aureus</i>												
Positivo	3	25,0	1	50,0	12	57,1	15	48,4	19	55,9	50	50,0
Negativo	9	75,0	1	50,0	9	42,7	16	51,6	15	44,1	50	50,0
Total	12	100,0	2	100,0	21	100,0	31	100,0	34	100,0	100	100,0

TABELA 2 — Distribuição das propriedades leiteiras segundo a positividade (N e %) para *S. aureus*, em amostras de leite examinadas, obtidas das diferentes linhas. Pirassununga, SP, 1981.

Linha de Leite	a		b		c		d		e		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Propriedades												
isolamento de <i>S. aureus</i>												
Positivo	1	100,0	1	100,0	12	60,0	11	64,7	11	78,6	36	67,9
Negativo	0	0	0	0	8	40,0	6	35,3	3	21,4	17	32,1
Total	1	100,0	1	100,0	20	100,0	17	100,0	14	100,0	53	100,0



TABELA 3 — Distribuição das 100 amostras de leite segundo o número de *S. aureus* por mililitro de leite e a positividade (N e %) para cepas enterotoxigênicas. Pirassununga, SP, 1981.

S. aureus por mililitro	Amostras de leite				
	Com cepas de <i>S. aureus</i> produtoras de enterotoxina				
	N	%	N	%	tipo
0	50	50,0	—	—	—
5	1	1,0	—	—	—
5 x 10	1	1,0	—	—	—
10 <sup>2</sup>	15	15,0	1	1,0	B
10 <sup>3</sup>	17	17,0	—	—	—
10 <sup>4</sup>	15	15,0	—	—	—
10 <sup>5</sup> e mais	1	1,0	—	—	—
TOTAL	100	100,0	1	1,0	

TABELA 4 — Distribuição das 201 cepas de *S. aureus*, segundo a fagotipagem com o Conjunto Básico Internacional Humano e sua relação com as 50 amostras positivas para essa bactéria, obtidas de 36 propriedades leiteiras. Pirassununga, SP, 1981.

S. aureus correspondente aos Grupos de fagos	Cepas de <i>S. aureus</i> *		Amostras de leite **		Propriedades leiteiras ***	
	N	%	N	%	N	%
I	5	2,5	5	10,0	5	13,9
II	6	3,0	2	4,0	2	5,6
III	68	33,8	31	62,0	26	72,2
NC	1	0,5	1	2,0	1	2,8
I/III	6	3,0	3	6,0	3	8,3
I/II/III	10	5,0	6	12,0	6	16,7
I/NC	9	4,5	4	8,0	4	11,1
II/III/NC	32	15,9	22	44,0	20	55,6
I/II/III/NC	16	8,0	11	22,0	9	25,0
I/II/III/NC	9	4,5	6	12,0	6	16,7
I/II/III/III/NC	4	2,0	4	8,0	4	11,1
Não Tipável	35	17,4	19	38,0	16	44,4

NC = Não Classificado

\* = para 201 cepas

\*\* = para 50 amostras positivas

\*\*\* = para 36 propriedades leiteiras com amostras positivas



TABELA 5 — Distribuição das 201 cepas de *S. aureus*, segundo a fagotipagem com o Conjunto Básico Internacional Bovino e sua relação com as 50 amostras positivas para essa bactéria, obtidas de 36 propriedades leiteiras. Pirassununga, SP, 1981.

S. aureus correspondentes aos Grupos de fagos	Cepas de S. aureus *		Amostras de leite **		Propriedades leiteiras ***	
	N	%	N	%	N	%
I	13	6,5	6	12,0	6	16,7
II	3	1,5	3	6,0	2	5,6
III	34	16,9	18	36,0	17	47,2
IV	35	17,4	14	28,0	13	36,1
M	6	3,0	6	12,0	5	13,9
I/III	4	2,0	3	6,0	3	8,3
I/IV	1	0,5	1	2,0	1	2,8
I/M	2	1,0	1	2,0	1	2,8
II/III	5	2,5	4	8,0	4	11,1
II/IV	4	2,0	4	8,0	4	11,1
II/M	2	1,0	2	4,0	1	2,8
III/IV	25	12,4	15	30,0	14	38,9
III/M	5	2,5	5	10,0	5	13,9
IV/M	7	3,5	6	12,0	6	16,7
I/III/IV	4	2,0	2	4,0	2	5,6
I/III/M	3	1,5	3	6,0	3	8,3
II/III/IV	7	3,5	6	12,0	6	16,7
II/IV/M	6	3,0	6	12,0	5	13,9
III/IV/M	6	3,0	6	12,0	6	16,7
II/III/M	3	1,5	3	6,0	3	8,3
I/III/IV/M	2	1,0	2	4,0	2	5,6
I/II/III/IV/M	1	0,5	1	2,0	1	2,8
Não Tipável	23	11,4	13	26,0	12	33,3

M — Miscelânea  
 \* — para 201 cepas  
 \*\* — para 50 amostras positivas  
 \*\*\* — para 36 propriedades leiteiras com amostras positivas

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-AHMED, A.A.; TERPLAN, G; SIMON, E. Enterotoxigenicity of staphylococcal strains isolated from milk and dairy products. *Arch. Lebensmitt. Hyg.*, 29:212-214, 1978.
- 02-ANDERSON, P.H.R. & STONE, D.M. Staphylococcal food poisoning associated with spray-dried milk. *J. Hyg.*, London, 53:387-397, 1955.
- 03-ANGELOTTI, R. Staphylococcal intoxications. In: RIEMAN, H., ed. *Foodborne infections and intoxications*. New York, Academic Press, 1969. p. 359-393.
- 04-ARMIJO, R.; HENDERSON, D.A.; TIMOTHEE, R.; ROBINSON, H.B. Food poisoning outbreaks associated with spraydried milk: an epidemiologic study. *Amer. J. publ. Hlth.*, 47:1093-1100, 1957.
- 05-BAIRD-PARKER, A.C. An improved diagnostic and seletive medium for isolating coagulase positive staphylococci. *J. appl. Bact.*, 25:12-19, 1962.
- 06-BAIRD-PARKER, A.C. Methods for classifying staphylococci and micrococci. In: GIBBS, B.M. & SKINNER, F.A., eds. *Identificação methods for microbiologists*. London, Academic Press, 1966. p. 59-64.
- 07-BAIRD-PARKER, A.C. Gram positive cocci. In: BUCHANAN, E.E. & GIBBONS, N.E. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8. ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974. p. 478-528.
- 08-BERGDOLL, M.S. Enterotoxin detection. In: HOBBS, B.C. & CHRISTIAN, J.H.B., eds. *The microbiological safety of food*. New York, Academic Press, 1973. p. 287-292.
- 09-BLAIR, J.E. & WILLIAMS, R.E.O. Phage typing of staphylococci. *Bull. Wild Hlth Org.*, 24:771-784, 1961.
- 10-CABRAL, T.M.A.; IARIA, S.T.; LIMA, A.W.O. Bactérias mesófilas coliformes totais e fecais e *Staphylococcus aureus* em queijo "coalho" comercializado em João Pessoa, Paraíba. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 9.; CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 12., São Paulo, 1983. *Programa. Resumos*. São Paulo, Associação Latino Americana de Microbiologia/ Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1983. p. 157.
- 11-CASMAN, E.P. & BENNETT, R.W. Detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Appl. Microbiol.*, 13:181-189, 1965.
- 12-CASMAN, E.P.; BENNETT, R.W.; DORSEY, A.E.; ISSAY, J.A. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin. Enterotoxin D. *J. Bact.*, 94:1875-1882, 1967.
- 13-CERQUEIRA-CAMPOS, M.L. & IARIA, S.T. Contagem de *Staphylococcus aureus* em carne moída e verificação da produção de enterotoxina pelas cepas isoladas. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 9.; CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 12., São Paulo, 1983. *Programa. Resumos*. São Paulo, Associação Latino Americana de Microbiologia/ Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1983. p. 146.
- 14-COMITE MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN HIGIENE DE LA LECHE. Ginebra, 1969. *Tercer informe*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1971. (Informes técnicos, 453)
- 15-CORLETT, D.A. & BROWN, M.H. pH and acidity. In: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. *Microbial ecology of foods: factor affecting life and death of microorganisms*. New York. Academic Press, 1980. v. 1, p. 92-111.
- 16-DACK, G.M. *Food poisoning*. 3. ed. Chicago, University of Chicago Press, 1964. p. 109-158.
- 17-DAVIDSON, I. A set of bacteriophages for typing bovine staphylococci. *Res. vet. Sci.*, 2:396-407, 1961.
- 18-DELAZARI, I. & LEITÃO, M.F.F. *Staphylococcus aureus* enteropatogênico em macarrão. *Colet. Inst. Tecnol. Alim.*, 7:485-497, 1976.
- 19-DONNELLY, C.B. LESLIE, J.E.; BLACK, L.A., LEWIS, K.H. Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese. *Appl. Microbiol.*, 15:1382-1387, 1967.
- 20-EVANS, J.B. Studies of staphylococci with special reference to the coagulase-positive types. *J. Bact.*, 55:793-800, 1948.

- 21-EVANS, J.B.; BUETTNER, L.G.; NIVEN JUNIOR, C.F. Evaluation of the coagulase test in the study of staphylococci associated with food poisoning. *J. Bact.*, 60:481-484, 1950.
- 22-FERNANDEZ, G.S. Microflora estafilocica de leite natural. *An. Fac. Vet. León*, 12:11-166, 1966.
- 23-FRAZIER, W.C. & WESTHOFF, D.C. *Food microbiology*. 3. ed. New York, McGraw-Hill, 1978. p. 432-438.
- 24-FURLANETTO, S.M.P.; NADER FILHO, A.; WILSON, D.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados a partir de leite de vacas mastíticas. *Rev. Microbiol.*, 18:138-143, 1987.
- 25-GARCIA, M.L.; MORENO, B.; BERGDOLL, M.S. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. *Appl. environm. Microbiol.*, 39:548-553, 1980.
- 26-GHOSH, S.S. & LAXMINARAYANA, H. Enterotoxigenic staphylococci in milk and milk products. *Indian J. anim. Sci.*, 42:492-498, 1972.
- 27-GHOSH, S.S. & LAXMINARAYANA, H. Incidence and distribution of staphylococci in milk and milk products. *Indian J. anim. Hlth*, 13:117-120. 1974.
- 28-GILBERT, R.J. Staphylococcal food poisoning and botulism. *Postgrad. med. J.*, 50:603-611, 1974.
- 29-GILBERT, R.J. & WIENEKE, A.A. Staphylococcal food poisoning with special reference to the detection of enterotoxin in food. In: HOOBS, B.C. & CHRISTIAN, J.H.B., eds. *The microbiological safety of food*. New York, Academic Press, 1973. p. 273-285.
- 30-GOMEZ, R.I.; ROMERO, M.R.; PARRILLA, M.C.; GONZÁLEZ-PACHECO, M. Incidencia de *S. aureus* em queijos a nível de mercado en el Distrito Federal. *Rev. lat.-amer. Microbiol.*, 21:67-68, 1979.
- 31-HIROOKA, E.Y. & MULLER, E.E. Isolamento, caracterização e enterotoxigenidade de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de produtos cárneos comercializados em Londrina, Paraná. *Ci. Tecnol. Alim.*, 2:123-133, 1982.
- 32-HOOBS, B.C. & GILBERT, R.J. *Food poisoning and food hygiene*. 4. ed. London, Edward Arnold, 1978. p. 366.
- 33-IARIA, S.T. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico em doces cremosos vendidos em padarias e confeitarias do Município de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde públ.*, São Paulo, 15:321-337, 1981.
- 34-INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. *Microorganisms in foods*. 1. Their significance and methods of enumeration. 2. ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978.
- 35-JAY, J.M. Toxinfecções alimentícias causadas por cocos gram-positivos. In: ----. *Microbiologia moderna de los alimentos*. Zaragoza, Acribia, 1973. p. 190-209.
- 36-KATO, E. & KUME, T. Enterotoxigenicity of bovine staphylococci isolated from California Mastitis Test-positive milk in Japan. *Jap. J. vet. Res.*, 28:75-85, 1980.
- 37-KUMAR, A. & GUPTA, R.S. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from foods and human sources. *Indian vet. J.*, 60:595-598, 1983.
- 38-LACHICA, R.V.F.; GENIGEORGIS, C.; HOEPRICH, P.D. Metachromatic agardiffusion methods for detecting nuclease staphylococcal activity. *Appl. Microbiol.*, 21:585-587, 1971.
- 39-LOMBAI, G.; JANOSI, L.; KATONA, F.; MAJOR, P., MILCH, H.; ORMAY, L.; TAKACS, J. Properties and food hygiene significance on strains of *Staphylococcus aureus* isolated from udders of cows. *Arch. Lebensmitt.-Hyg.*, 31:206-209, 1980.
- 40-MARKAM, N.P. & MARKHAM, J.G. Staphylococci in man and animal. Distribution and characteristics of strains. *J. comp. Path.*, 76:49-56, 1966.
- 41-MORRISON, S.M.; FAIR, J.F.; KENNEDY, K.K. *Staphylococcus aureus* in domestic animals. *Publ. Hlth Rep.*, Washington, 76:673-677, 1961.
- 42-NADER FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em leite de vacas com mastite subclínica. *Rev. Microbiol.*, 19:369-373, 1988.
- 43-NAKAGAWA, M. Studies on bacteriophage typing of a staphylococci isolated from bovine milk. III. Typing by means of a new phage set. *Jap. J. vet. Res.*, 8:331-342, 1960.

- 44-OLSON, J.C.; CASMAN, E.P.; BAER, E.F.; STONE, J.E. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* cultures isolated from acute cases of bovine mastitis. *Appl. Microbiol.*, 20:605-607, 1970.
- 45-PETERSON, A.C.; BLACK, J.J.; GUNDERSON, M.F. Staphylococci in competition. I. Growth of naturally occurring mixed populations in precooked frozen foods during defrost. *Appl. Microbiol.*, 10:16-22, 1962.
- 46-RAHMAN, H. & BAXI, K.K. Studies on staphylococcal mastitis in bovine. *Indian vet. J.*, 60:865-869, 1983.
- 47-RUDGE, A.C. *Aspectos microbiológicos e sanitários de linguiça tipo fresco: análise de contaminação por Staphylococcus aureus e Clostridium perfringens*. Botucatu, 1980. /Tese de Livre-docência - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/
- 48-SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; MADER FILHO, A.; FURLANETTO, S.M.P.; ROSSI JUNIOR, O.D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em amostras de leite de vacas mastíticas. *Ars vet.*, 2:69-74, 1986.
- 49-SETO, J.T. & WILSON, J.B. Bacteriophage typing of micrococci of bovine origin. *Amer. J. vet. Res.*, 19:241,246, 1958.
- 50-SILES VILLARROEL, M. *Contribuição ao estudo de venenos de serpentes do gênero Bothrops (B. jararaca, B. alternatus, B. Insularis, B. jararacassu, B. atrox e B. cotiara)*. São Paulo, 1972. /Tese de doutoramento - Instituto de Ciências Biomédicas da USP/
- 51-SIMKOVICOVA, M. & GILBERT, R.J. Serological detection of enterotoxin from food-poisoning strains of *Staphylococcus aureus*. *J. med. Microbiol.*, 4:19-30, 1971.
- 52-SOLE-VERNIN, C. Fagotipagem de *Staphylococcus aureus*. *Rev. bras. Ortop.*, 11:31-34, 1976.
- 53-SUBCOMMITTEE ON TAXONOMY OF STAPHYLOCOCCI AND MICROCOCCI. Minutes of first meeting 1964. *Int. Bull. bact. Nomencl.*, 15:107-108, 1965.
- 54-TAKESHIGE, K.; WATANABE, K.; IGARASHI, H.; SHINGAKI, M.; TERAYAMA, T. Detection of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and some characteristics with special reference to enterotoxin producibility and coagulase types of isolates. *Jap. J. vet. Sci.*, 45:355-362, 1983.
- 55-TROLLER, J.A. & CHRISTIAN, J.H.B. *Water activity and food*. New York, Academic Press, 1978.
- 56-WIENEKE, A.A. Enterotoxin production by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods and human beings. *J. Hyg.*, London, 73:255-262, 1974.
- 57-WILLIAMS, R.E.O.; RIPPON, J.E.; DOWSETT, L.M. Bacteriophage typing of strains of *Staphylococcus aureus* from various sources. *Lancet*, 264:510-514, 1953.
- 58-WILSON, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em leite a ser pasteurizado. *Rev. Saúde públ.*, São Paulo, 11:1-11, 1977.
- 59-ZELANTE, F. *Contribuição para o estudo de Staphylococcus isolados de canais radiculares*. São Paulo, 1974. /Tese de Livre-docência - Instituto de Ciências Biomédicas da USP/

Recebido para publicação em 09/05/1989

Aprovado para publicação em 15/08/1989