

Mestrado em Tecnologia Alimentar

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

"Behaviour of *Staphylococcus aureus* under different growth conditions"

Dissertação realizada por: Bruna Maria Ferreira de Jesus, n.º 17459

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Eduarda Marques Madeira Silva Potes

Outubro de 2009

Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri.

Mestrado em Tecnologia Alimentar

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

"Behaviour of *Staphylococcus aureus* under different growth conditions"



141358

Dissertação realizada por: Bruna Maria Ferreira de Jesus, n.º 17459

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Eduarda Marques Madeira Silva Potes

Outubro de 2009

Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri.

Índice:

Objectivo	pág.5
Resumo.....	pág.6
Introdução	
História.....	pág.8
Taxonomia.....	pág.9
Enterotoxinas estafilocócicas.....	pág.17
Efeitos dos factores condicionantes de crescimento, efeitos intrínsecos, extrínsecos e implícitos.....	pág.29
Efeito da competição.....	pág.31
Sumário dos factores importantes ao desenvolvimento de <i>Staphylococcus aureus</i>	pág.32
Contaminação e deterioração de alimentos.....	pág.33
Factores ligados à deterioração dos alimentos	pág.36
Factores intrínsecos	pág.37
pH.....	pág.37
Actividade da água.....	pág.41
Potencial oxirredução	pág.43
Composição química dos alimentos.....	pág.44
Estrutura biológica.....	pág.45
Factores extrínsecos	pág.46
Temperatura.....	pág.46
Humidade do ar ambiente.....	pág.47
Legislação em vigor.....	pág.49
O risco de <i>Staphylococcus aureus</i> em alimentos e animais.....	pág.52
Alimentos mais afectados por <i>Staphylococcus aureus</i>	pág.54

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Objectivo:

O trabalho realizado pretende avaliar o crescimento de *Staphylococcus aureus*, quando submetido a diferentes condições ambientais.

Submeteram-se duas estirpes de *Staphylococcus aureus* de origem alimentar, uma estirpe de referência (ATCC) e uma estirpe isolada de um alimento a diferentes condições de ambientais, ou seja, a três valores de pH diferentes (pH 4, 5,5 e 7), a três concentrações de NaCl (0.5%, 7% e 15%) e a três valores de temperatura (7°C, 37°C e 55°C), de forma a traçar a sua curva de crescimento e avaliar a seu desenvolvimento e o seu comportamento ao longo do tempo, tendo em conta estes factores.

A curva de desenvolvimento permite-nos observar o comportamento de *Staphylococcus aureus*, um contaminante alimentar, que provoca graves intoxicações, em diferentes condições ambientais de forma a podermos minimizar e prevenir o risco de contaminação através do controlo de factores ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento.

Os dados obtidos serão úteis para a selecção e promoção de regras de prevenção de contaminação por este microrganismo, atendendo às características físico-químicas de cada tipo de alimento, com o objectivo de reduzir a taxa de incidência de intoxicações alimentares com esta etiologia

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Resumo:

Realizou-se um trabalho experimental com o objectivo de obter informação sobre a evolução do crescimento de *Staphylococcus aureus*.

Foram utilizadas duas estirpes de *Staphylococcus aureus*, uma isolada a partir de rissóis de frango e uma estirpe de referência, a ATCC n.º29213, estas estirpes foram sujeitas a 3 valores de pH diferentes (que representam os valores de pH que é possível, ou seja pH 4, 5,5 e 7, a 3 valores de concentração de NaCl, nomeadamente, 0,5%, 7% e 15%. A temperatura de desenvolvimento será de 7°C, 37°C e 50°C.

Utilizaram-se dois métodos para avaliar o crescimento de *Staphylococcus aureus*, ao longo do tempo, nomeadamente o Método Turbidimétrico e o Método de contagem de unidades formadoras de colónias (método das diluições sucessivas).

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Abstract:

Carried out experimental work in order to obtain information on the evolution of the growth of *Staphylococcus aureus*.

We used two strains of *Staphylococcus aureus*, a strain isolated from a chicken patties and one reference strain, ATCC N.º 29213, these strains were subjected to 3 different pH values (which represent the values of pH it is possible, or is pH 4, 5.5 and 7, the 3 values of NaCl concentration, namely, 0.5%, 7% and 15%. The growth temperature is 7 °C, 37°C and 50°C.

We used two methods to evaluate the growth of *Staphylococcus aureus*, over time, including the turbidimetric method and the method of counting colony forming units (method of successive dilutions).

Introdução:

História:

Staphylococcus, (que significa cacho) foi assim chamado pela primeira vez pelo cirurgião escocês, Sir Alexander Ogston, que foi o primeiro a publicar documentos onde se pronunciava sobre a presença deste organismo no “pus”, retirado de abcessos humanos, citando que este podia provocar doenças graves. Dois anos mais tarde, surgiu Rosenbach que após ter descrito o seu crescimento em cultura pura, designou as colónias de “coccus” de cor alaranjada, por *Staphylococcus aureus*. (15)

A primeira referência sobre a observação da relação de *Staphylococcus* com as intoxicações alimentares, foi efectuada por Vaughan e por Sternberg, em 1884. Esta investigação foi levada a cabo depois de ter ocorrido um grande surto da doença (intoxicação alimentar), em Michigan, depois da ingestão de um queijo. Através da observação do queijo ao microscópio, os dois descobriram que o queijo tinha sido contaminado por um organismo de forma esférica, o qual designaram por *micrococcus*. Em seguida, foram consumidos extractos desse mesmo queijo que, conseqüentemente, provocaram uma intoxicação. Foi então que concluíram que a causa provável era um veneno que se desenvolvia no queijo como resultado da actividade vital dos *micrococcus* ou talvez alguns outros microrganismos que apareceram e que pela acção do seu próprio veneno, estivessem mortos. (15)

Em 1914, Barber demonstra que após a ingestão de leite proveniente de uma vaca que padecia de mastite e armazenado sem refrigeração, esse leite provoca uma intoxicação alimentar estafilocócica. A importância deste trabalho não foi reconhecida. Em 1930 é que foi redescoberta, por Dack e por colaboradores. Mostraram que uma cultura de *Staphylococcus*, amarela, (extraída de forma estéril) isolada a partir do creme de um bolo de natal, causou uma típica intoxicação alimentar, em voluntários humanos. Desde esse tempo tem-se demonstrado que *Staphylococcus aureus* é um organismo patogénico e responsável por intoxicações alimentares. Numerosos artigos têm sido publicados à cerca de métodos de detecção e isolamento deste microrganismo e da enterotoxina que este produz e que causa intoxicações alimentares. (5) (15)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Em 1884, Rosenbach descreveu dois tipos de *Staphylococcus* tendo em conta os pigmentos das colónias e propôs a nomenclatura adequada: *Staphylococcus aureus* (amarelo) e *Staphylococcus albus* (branco). (32)

Esta última espécie, *Staphylococcus albus* (branco), é agora chamada *Staphylococcus epidermidis*. Embora mais de 20 espécies de *Staphylococcus* sejam descritas no Bergey's Manual (2001), as interações do *Staphylococcus aureus* e do *Staphylococcus epidermidis* com o ser humano são mais significativas. (32)

Staphylococcus aureus é considerado o segundo ou terceiro patógeno mais comum e causa de graves surtos de intoxicação alimentar, sendo *Salmonella spp.*, a primeira e o *Staphylococcus aureus* está em concorrência directa como *Clostridium perfringens*. (32)

Taxonomia:

Nos últimos 20 anos, a taxonomia desta bactéria têm sofrido algumas alterações. Em 1986 apenas eram reconhecidas 19 espécies, enquanto, até 1995 foram reconhecidas 30 espécies. A diferenciação das espécies é efectuada tendo em conta o estudo do ADN e por estudos imunoquímicos. (15)

Taxonomicamente, o género *Staphylococcus* pertence à família bacteriana *Staphylococcaceae*, família que inclui três géneros menos conhecidos, *Gamella*, *Macrococcus* e *Salinicoccus*. (32)

De acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* - 1986, a família Micrococcaceae é composta por quatro géneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus*, sendo o género *Staphylococcus* actualmente dividido em cerca de 42 espécies registadas no banco de dados. (13) (19)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Staphylococcus aureus são bactérias Gram-positivos, coagulase-positiva, com forma esférica, e cor amarelada, que se encontram em aglomerados microscópicos, semelhantes uvas. Estas são culturas bacteriológicas das fossas nasais e pele dos seres humanos. (32)

São imóveis, com diâmetro variando entre 0,5 a 1,5 μ m, não formadoras de esporos podendo aparecer de forma isolada, em pares, cadeias curtas ou em cachos (Figura 1A-B). (22)

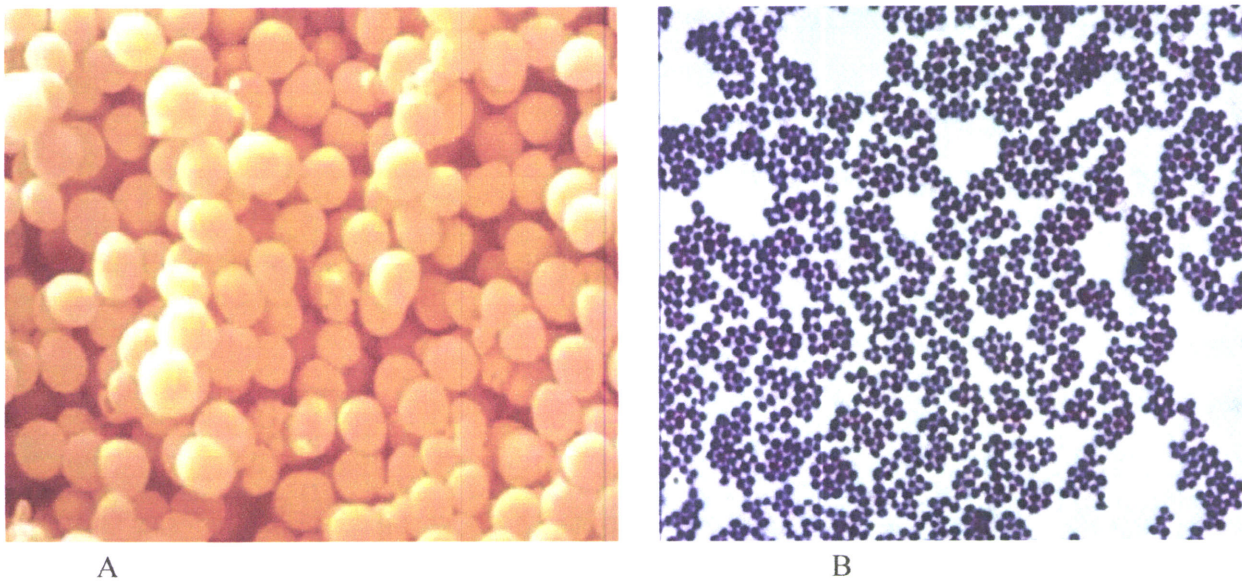


Figura 1- Morfologia (A) e característica morfotintorial pela técnica de coloração de Gram (B) de microrganismos pertencentes ao género *Staphylococcus spp.*;

Fonte: Science Photo Library (2007) (17) e Tortora, (2005) (21);

Diferem das espécies do género *Micrococcus spp* por serem oxidase-negativa, fermentarem glicose em anaerobiose, possuírem ácido teicóico como constituinte de sua parede celular e ADN com conteúdo bastante reduzido de GC (30 a 39%). (22)

Os *Staphylococcus aureus* são anaeróbios facultativos, que crescem por respiração aeróbia ou por fermentação, da qual resulta a produção de ácido láctico (maioritariamente). (32)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

A parede celular dos estafilococos é resistente á lisozima e sensível a lisostafina, que cliva especificamente as pontes cruzadas de peptidoglicano com pentaglicina. (22)

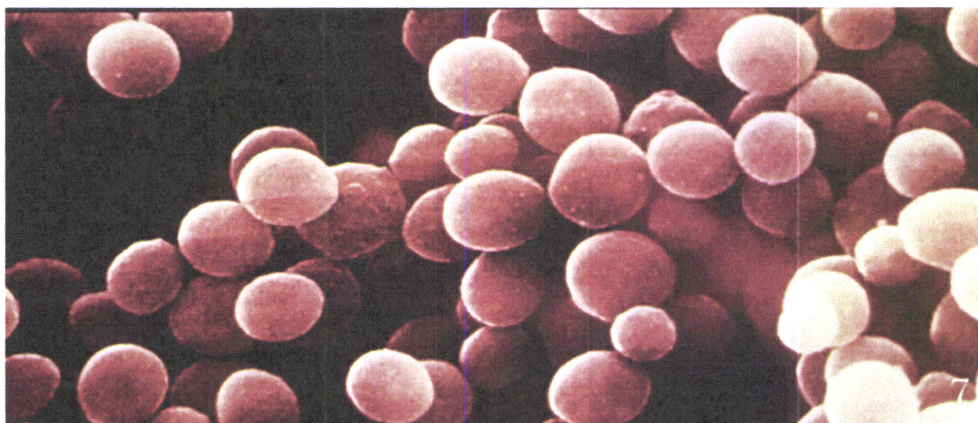
Estes microrganismos são resistentes a condições severas e podem ser recuperados de ambientes não-fisiológicos meses após a inoculação. Um dos principais patogênicos oportunistas deste gênero, *S. aureus*, coloniza uma porção extensa da população humana. (8)

No entanto, considera-se que *Staphylococcus aureus* desenvolvem-se em grandes colônias amarelas em meios ricos, a bactéria é frequentemente hemolítica em agár sangue. (32)

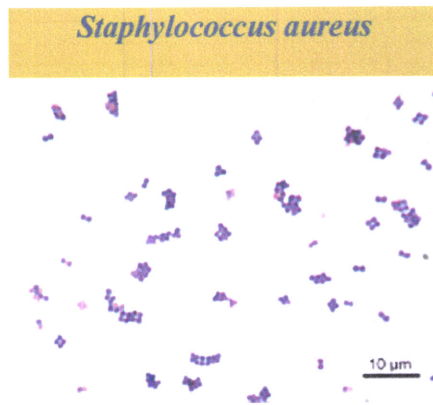
Alguns cocos estafilococos coagulase positiva, produtores de toxinas são muito halotolerantes (toleram concentrações de NaCl entre 10% a 20%), e toleram também bastante bem os nitritos (conseguindo até crescer em soluções marinadas e em superfícies de carnes previamente temperadas (marinadas)). Também toleram bastante bem os açúcares dissolvidos (de 50% a 60% de sacarose). (12)

São fermentativos e proteolíticos e na maioria dos alimentos, geralmente, não produzem odores repugnantes e não os convertem em alimentos desagradáveis. (12)

Figura 2:*Staphylococcus aureus*. (32)



“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”



Staphylococcus aureus com
técnica Gram

Classificação científica

Reino: Monera

Filo: Firmicutes

Classe: Bacilli

Ordem: Bacillales

Família: Staphylococcaceae

Gênero: *Staphylococcus*

Espécie: *S. aureus*

Nome binomial

Staphylococcus aureus

(Rosenbach, 1884)

Figura 3: *Staphylococcus aureus* (1)

Importantes características fenotípicas de *Staphylococcus aureus*: (32)

- ◆ Gram-positivas;
- ◆ “Cachos” formados por cocos;
- ◆ Anaeróbios facultativos;
- ◆ A fermentação de glicose produz principalmente ácido láctico;
- ◆ Catalase positiva;
- ◆ Coagulase positiva;
- ◆ Colónias com um tom de Amarelo dourado, em ágar;
- ◆ Flora normal dos seres humanos encontrados nas fossas nasais, pele e membranas mucosas;
- ◆ Patogénico de humanos, provoca uma vasta gama de infecções, assim como intoxicação alimentar e síndrome de choque tóxico;

Em contacto com as células humanas tem função destrutiva e é adquirida através de cortes na pele, contacto com doentes e por ingestão de alimentos. (32)

Staphylococcus aureus são considerados comensais, encontra-se nas superfícies dos corpos de animais de sangue quente. As doenças que *Staphylococcus aureus* causa inclui graves infecções, como a septicemia e graves intoxicações alimentares. (15)

Staphylococcus aureus é omnipresente, encontra-se nas membranas mucosas e na pele da maioria dos animais de sangue quente. É um patogénico oportunista e habitualmente um comensal, pode frequentemente causar uma infecção através de uma ferida ou pela mudança de fisiologia do hospedeiro, devido a alterações hormonais. A qualquer momento, 50% dos Humanos podem ser hospedeiros deste microrganismo. Este aloja-se normalmente na zona nasal e perineal, podendo também colonizar as mãos e outras partes do corpo. Por exemplo, se a pele está debilitada ou se está exposta a condições húmidas. Este microrganismo é resistente às circunstâncias secas e pode colonizar equipamentos de produção alimentar, difíceis de higienizar e que podem ser guardados húmidos. É muitas vezes encontrado no pó dos sistemas de ventilação e ciclones. (15)

A colonização da pele por essa bactéria ocorre provavelmente pela sua capacidade de resistir a altas concentrações de lípidos, bem como por produzirem proteínas de

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

superfície que se ligam a fibronectina, presentes na superfície das células do hospedeiro. Estas proteínas são denominadas de proteínas de ligação a fibronectina A e B, sendo consideradas importantes factores de virulência, uma vez que promovem a ligação da bactéria às células do hospedeiro. (22)

Staphylococcus aureus forma vários tipos de substâncias (substâncias agressivas e exotoxinas) associados com infecções e doenças. Estas substâncias designam-se por factores de virulência. Existe uma grande extensão de substâncias constituintes das paredes das células, como ácidos teicoicos, assim como exotoxinas, incluindo estafiloquinase, fosfatase, coagulase, catalases, proteases, nucleases e lipases, e por último, mas não menos grave as enterotoxinas que provocam as intoxicações alimentares. (15)

Possui proteína A que neutraliza os anticorpos, toxina alfa que destrói a membrana das células, toxina beta que hidrolisa os lípidos, toxina esfoliativa que provoca a esfoliação da pele, enterotoxina que activa o sistema imunológico de forma inadequada e toxina da síndrome do choque que activa os linfócitos. (15)

S.aureus é responsável por um espectro muito difundido de infecções em humanos e em diferentes espécies animais. Constitui o mais comum agente etiológico da mastite bovina contagiosa, com perdas economicamente relevantes para a indústria leiteira causando redução na qualidade do leite e direccionando a perda em produção e uso elevado de drogas e serviços veterinários. Produz e secreta 30 ou mais factores de patogenicidade específicos que interferem com as defesas do hospedeiro. (22)

Staphylococcus aureus provoca uma variedade toxi-infecções em seres humanos. Provoca lesões superficiais da pele, tais como **furúnculos**, infecções mais graves, como a **pneumonia**, **mastite**, **flebite**, **septicemia**, **meningite**, e **infecções urinárias** e profundamente enraizado em infecções, tais como **osteomielite** e **endocardite**. *S. aureus* é uma das principais causas de internamento devido à infecção de feridas cirúrgicas e infecções associadas com a contaminação de dispositivos médicos. (32)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Staphylococcus aureus provoca **intoxicação alimentar** por libertar enterotoxinas em alimentos e **síndrome de choque tóxico** através da libertação de toxinas na corrente sanguínea. (32)

A intoxicação alimentar provocada pelo *Staphylococcus aureus* é uma doença causada pela ingestão de alimentos que contém enterotoxinas produzidas por células enterotoxigénicas de *Staphylococcus aureus*. Há sete tipos de enterotoxinas que o *Staphylococcus aureus* é capaz de produzir. As enterotoxinas são resistentes ao calor, logo não são destruídas pelo aquecimento dos alimentos. (15)

O tipo de enterotoxina produzida, depende do tipo de alimento onde o *Staphylococcus* cresce e das condições ambientais que permitem o seu crescimento. (12)

O intervalo de temperaturas dentro do qual ocorre a multiplicação e a produção de toxina está compreendido entre os 4°C e os 46°C, aproximadamente, tendo em conta as características do alimento onde este se desenvolve. (12)

O aparecimento dos sintomas é rápido de 20 minutos, a 2 horas após a ingestão do alimento com a enterotoxina. O aparecimento dos sintomas e sua intensidade dependem da sensibilidade das pessoas às enterotoxinas, quantidade de toxina produzida no alimento, quantidade de alimento ingerido e saúde geral dessas pessoas. Os sintomas característicos são náusea, vômitos, cólicas abdominais e prostração. Em casos mais graves, podem ocorrer dores de cabeça, dores musculares e alterações da pressão arterial e da pulsação. A recuperação demora cerca de dois dias. (15)

O diagnóstico médico é difícil, pois os sintomas são semelhantes aos causados por várias outras doenças. O diagnóstico é baseado na história do paciente e em dados laboratoriais sobre a presença de *Staphylococcus aureus* no alimento suspeito. Entretanto estes indícios normalmente não são suficientes para o diagnóstico adequado porque as enterotoxinas, que causam a intoxicação, são resistentes ao calor e alimentos em que não há o microrganismo podem conter as enterotoxinas. A maneira mais correcta de confirmar o diagnóstico é demonstrar a presença da toxina estafilocócica no alimento em

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

causa. Não existe análise laboratorial sensível, suficiente para detectar a presença das enterotoxinas no sangue ou nas fezes dos doentes. (15)

A quantidade necessária para desencadear a intoxicação num adulto é de 1 micrograma, que corresponde à quantidade encontrada no alimento quando a contaminação por *Staphylococcus aureus* atinge 100.000 células por grama. (15)

Uma proteína de superfície espécie-específica ancorada à parede celular do *S. aureus*, proteína A estafilocócica (SpA, do inglês *Staphylococcus protein A*), tem a habilidade de interagir com muitos componentes do hospedeiro, possivelmente desenvolvendo um papel como factor de virulência em infecções. Esta proteína encontra-se ancorada à parede celular da maioria dos *S. aureus*. (22)

A produção da coagulase é um importante determinante fenotípico na caracterização de isolados de *S. aureus*. Geralmente está associada a patogenicidade, apesar do seu papel como factor de virulência ainda não estar esclarecido. Sabe-se que o coágulo produzido por esta enzima resulta no acúmulo de fibrina ao redor das células bacterianas, isolando a área infectada e dificultando a acção dos mecanismos de defesas do hospedeiro. (22)

As exotoxinas são proteínas ou enzimas produzidas no interior de algumas bactérias Gram-positivas, decorrentes da multiplicação e metabolismo dos microrganismos, e libertadas na corrente sanguínea. Classicamente são agrupadas em três tipos, de acordo com seu modo de acção:

- ▣ Citotoxina: que destroem as células do hospedeiro ou afectam as suas funções;
- ▣ Neurotoxinas: que interferem com a transmissão normal de impulsos nervosos;
- ▣ Enterotoxinas: que afectam as células que revestem o trato gastrointestinal.

As principais exotoxinas produzidas pelos estafilococos são as enterotoxinas, responsáveis pela intoxicação alimentar estafilocócica no homem. São produzidas por *S. aureus*, no entanto, outras espécies coagulase positiva, *S. intermedius* e *S. hyicus* foram apontadas como enterotoxigénicas, bem como espécies coagulase negativas. (22)

Enterotoxinas estafilocócicas

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas extracelulares de baixo peso molecular (26.900 a 29.600 Daltons) pertencentes à família das toxinas pirogênicas (PT), provenientes de espécies de estafilococos, cuja estrutura, função e sequência de nucleotídeos são semelhantes entre si. Também estão incluídas nesta família a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), as toxinas esfoliativas tipos A e B. (22)

Além disso, as enterotoxinas são capazes de estimular a produção de citocinas nas concentrações de 10^{-13} a 10^{-16} molar. (22)

São resistentes à hidrólise pelas enzimas gástricas mantendo sua actividade no trato digestivo após ingestão e são estáveis ao aquecimento a 100°C durante 30 minutos, não sendo inactivadas totalmente pela pasteurização, isto significa que a actividade biológica das enterotoxinas permanece inalterada mesmo após o processamento térmico dos alimentos. Alguns *S. aureus* isolados produzem quantidades detectáveis de enterotoxinas após 24 horas de incubação a 30°C. (11)

Com base nas suas características antigénicas, existem diferentes enterotoxinas estafilocócicas identificadas. Enquanto SEA, SEB, SEC, SED, SEE representam tipos clássicos, quatro enterotoxinas estafilocócicas adicionais (SEG, SEH, SEI e SEJ) também foram descritas. O “alfabeto” das enterotoxinas estafilocócicas expandiu-se pela detecção de novos genes que codificam as enterotoxinas SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU e SEV. Além disso, algumas variantes também foram identificadas, como por exemplo a SEC, SEG, SEI e SEU. Aproximadamente 95% dos casos de intoxicação alimentar estafilocócica são causados pelas enterotoxinas estafilocócicas dos tipos SEA a SEE. Os 5% restantes de intoxicações devem estar associadas com outras enterotoxinas identificadas. A incidência de casos de intoxicação alimentar devido a novos tipos de enterotoxinas estafilocócicas já foi relatada em França, Japão e Inglaterra. (9)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

As enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* têm baixo peso molecular entre 26000 a 34000Da. Estas são proteínas que estão associadas a uma cadeia polipéptidos e que contém grandes quantidades de lisina, tirosina e aspartame e ácidos glutâmicos. A composição aminoácidos destas enterotoxinas SEA, SED, SEE e das enterotoxinas SEB, SEC1, SEC2; SEC3, são similares. É sugerido que estas são produzidas pelo organismo (*Staphylococcus aureus*), de duas formas, a produção dos tipos SEB e SEC são controlados pelo cromossoma plasmático e são produzidos quase no final da fase estacionária de crescimento como metabolitos secundários, enquanto, que os tipos SEA e o SEE são controlados pelo cromossoma (SED controlo plasmático) e são produzidos durante a fase logarítmica de crescimento. Estas diferenças são espelhadas por diferentes tipos de contaminação dos alimentos, ou seja, formam enterotoxinas diferentes tendo em conta as características dos alimentos. A maioria das intoxicações alimentares envolve enterotoxinas A e D, as quais são formadas em alimentos com intervalos mais alargados de pH, aw, enquanto o B e o C desenvolvem-se em valores mais baixos. Os biótipos humanos de *Staphylococcus aureus* produzem enterotoxinas mais frequentemente do que as aves e outros biótipos animais. (15)

A forma de acção da toxina não tem sido completamente elucidada, é citado que os vómitos e a diarreia são resultado da estimulação de neuroreceptores no tracto intestinal e transmissão do estímulo do vómito para o cérebro, através de nervo vago e noutras partes sensíveis do sistema nervoso. (15)

O tamanho da enterotoxina que provoca a doença depende do peso e da sensibilidade individual, mas de forma geral basta apenas 0,1 - 1mg/kg para causar uma intoxicação num Humano. (15)

Os dois testes mais usados para distinguir os *Staphylococcus aureus* de outros tipos de *Staphylococcus* são o teste da coagulase (coagulação do plasma do sangue) e o teste da termoestabilidade da nuclease (quebra do ADN pela nuclease resistente á fervura). Contudo, os testes mencionados não são absolutamente específicos para *Staphylococcus aureus*. Quase todas as estirpes de *Staphylococcus* coagulases e termonucleases positivas, isoladas de carnívoros, em cães e em algumas aves, são agora são designados por

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Staphylococcus. intermedius. Este *Staphylococcus* é distinguido de *Staphylococcus aureus* pelo metabolismo e estrutura celular, mas é mais reconhecido pela redução de telurite, formando então colônias brancas em agár Baird-Parker. Coagulase positiva, frequentemente encontrada em porcos e galináceos e em alguns animais de carne, é designado por *S. hyicus*. Este microrganismo é muitas vezes confundido com *Staphylococcus aureus* e pode ser distinguido apenas pela aplicação de uma série de testes bioquímicos. Outras espécies de *Staphylococcus* podem produzir pequenas quantidades de coagulase e por esta razão é recomendado que apenas os produtores mais potentes de coagulase sejam reconhecidos como *Staphylococcus aureus*. (15)

Os testes biológicos clássicos de detecção da enterotoxina têm sido substituídos por outros mais rápidos e precisos. Actualmente o mais utilizado é o teste ELISA. Este método detecta 0,1 - 10ng de toxina em 1 mL de extracto de alimento. O teste ELISA é mais sensível do que o teste Látex, mas é menos fácil de usar. Ambos os métodos são adequados para uso no laboratório, mas o mais recente, ELISA. Contudo, mesmo com este teste mais desenvolvido, ELISA, pode haver falsos resultados, logo é recomendado que sejam mais testes para confirmação da identificação. (15)

A partir de 1950, quando os antibióticos passaram a ser amplamente utilizados, iniciou-se o fenómeno de resistência bacteriana. Desde então, o problema de resistência aos antibióticos passou a representar importância considerável em Saúde Pública. Hoje, o desenvolvimento de resistência por certas bactérias patogénicas é mais rápido que a capacidade da indústria para produzir novas drogas para contrariar esse efeito. (14)

A aquisição sucessiva de resistência à maioria das classes de agentes antimicrobianos, tais como, penicilinas, macrolídeos, aminoglicosídeos, cloranfenicol e tetraciclina tem dificultado o tratamento e o controle de infecções estafilocócicas e intoxicações alimentares. (22)

A utilização difundida de metilina e outras penicilinas semi-sintéticas no final dos anos 60 induziu à emergência de *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), que continua a persistir tanto em ambientes de cuidado à saúde como na comunidade. (20)

Actualmente, mais de 60% dos isolados de *S. aureus* são resistentes a metilina e alguns isolados têm desenvolvido resistência a mais de 20 diferentes agentes antimicrobianos.

14)

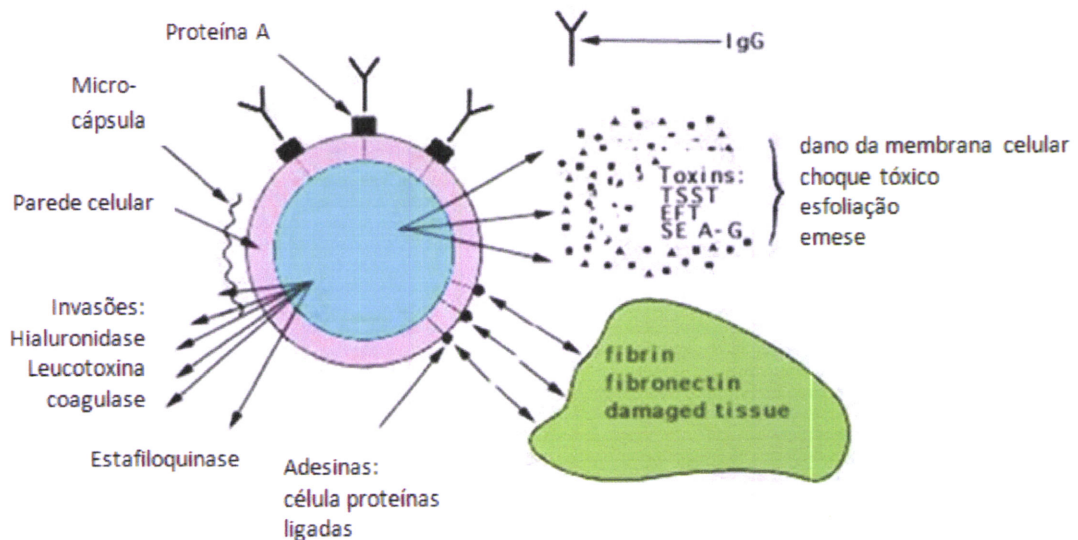
A terapia efectiva contra a maior parte das linhagens de estafilococos multirresistentes, incluindo MRSA, é o glicopeptídeo vancomicina. Entretanto, a emergência em 1997 de *S. aureus* com níveis intermediários de resistência à vancomicina e a mais recente emergência de *S. aureus* com altos níveis de resistência à vancomicina tem limitado sua efectividade. Tal *S. aureus* recebeu a denominação VISA (*Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina) e actualmente é denominado simplesmente de VRSA (*Staphylococcus aureus* vancomicina resistente). Em *S. aureus*, a resistência múltipla resulta da presença de plasmídios, mutações cromossómicas e de elementos transponíveis. (7)

Evidências directas indicam que o uso de antimicrobianos em animais selecciona bactérias resistentes que podem ser transferidas para humanos através dos alimentos ou contacto directo com os animais. (1)

As bactérias resistentes que são encontradas em animais produtores de alimentos podem contaminar os produtos alimentícios e serem transferidas para humanos através da cadeia alimentar. No trato gastrointestinal elas podem transferir genes que conferem a resistência antimicrobiana a outras bactérias da própria espécie ou de espécies não relacionadas patogénicas ou não. (7)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Figura 4: Figura adaptada que representa os factores determinantes na virulência de *Staphylococcus aureus*. (32)



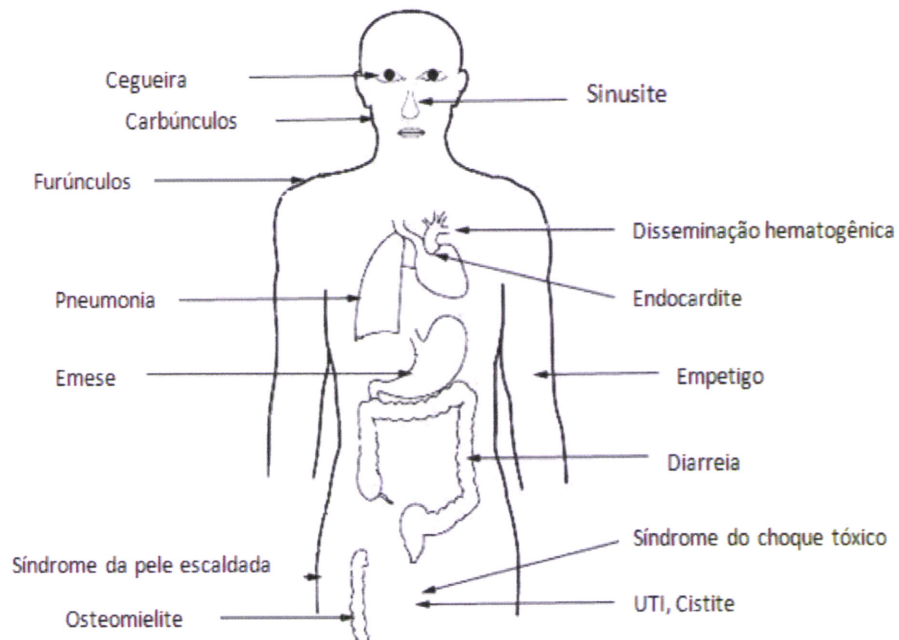
Para a maioria das doenças causadas por *Staphylococcus aureus*, a patogénese é multifactorial, por isso é difícil determinar com precisão o papel de um determinado factor. Existem, no entanto, as correlações entre estirpes isoladas de doenças. A aplicação da biologia molecular levou a avanços para descobrir a patogénese das doenças provocadas por *Staphylococcus aureus*. (32)

Existem 32 espécies de *Staphylococcus*. *Staphylococcus aureus* liga-se aos tecidos do organismo devido às suas proteínas de superfície, facilitando a ligação a organismos revestidos com colagénio, fibronectina e fibrinogénio. Isto permite que a bactéria adira a dispositivos como suturas, cateteres e próteses valvulares. (29)

Muitos recém-nascidos e a maioria das crianças e dos adultos são colonizados intermitentemente pelo *S. aureus*, que se pode alojar na zona naso-farínge, ocasionalmente na pele e na roupa, e mais raramente na vagina e no recto. A partir destes locais, o *S. aureus* pode contaminar qualquer zona da pele ou das membranas mucosas, ou outras pessoas, por transferência directa ou aerossol. (29)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

A pele e as membranas mucosas intactas são barreiras eficazes contra a invasão local. No entanto, se esta barreira se romper devido a trauma, cirurgia ou dispositivos existentes, o *S. aureus* pode passar a ter acesso ao tecido subjacente e originar um abscesso local que consiste em tecido necrosado, fibrina e glóbulos brancos vivos ou mortos. (29)

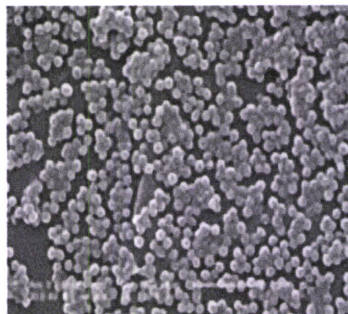


Figura

5:

Figura adaptada que representa as zonas do organismo afectadas por infecções e doenças causadas por *Staphylococcus aureus*. (32)

Staphylococcus aureus resistente à meticilina.



“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Figura 6:Micrografia por electrões da SARM ou MRSA (1)



Figura 7:Abcesso cutâneo, por SARM (1)

A **resistência** bacteriana a antibióticos é um sério problema para a Saúde Pública, pois bactérias resistentes podem ser transmitidas ao homem através de alimentos contaminados. (22)

S. aureus também produz outras toxinas extracelulares como a toxina-1 da síndrome do choque tóxico, responsável pela síndrome do choque tóxico em humanos e as toxinas esfoliativas, causadoras da síndrome da pele escaldada. (22)

O desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e eficazes para a detecção de patogénicos de origem alimentar tem recebido maior atenção nos recentes anos devido ao acréscimo da consciência pública dos riscos de saúde associados com a contaminação microbiológica de alimentos. (22)

A PCR é aplicada como um método para a detecção dos genes responsáveis pelas toxinas estafilocócicas. Uma variação da PCR, a PCR-Multiplex, permite numa mesma reacção, detectar vários genes responsáveis pelas toxinas, contribuindo para o estudo epidemiológico destas bactérias e seu envolvimento em doenças de origem alimentar. (2)

O isolamento do ARNm como um método para estudar regulação transcricional é usado para tentar estabelecer se os genes são de fato funcionais no ambiente nativo. A expressão das toxinas-alvo, através da detecção da sequência do ARNm responsável pela produção das mesmas, pode determinar o potencial tóxico dos microrganismos. (22) (2)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Outro aspecto importante é a presença de resíduos de antibióticos que pode interferir directamente na qualidade do leite e nos processos industriais, inibindo culturas sensíveis. Actualmente, tem-se enfatizado a possibilidade de resíduos de antimicrobianos em alimentos provocarem aumento de resistência nas bactérias presentes na flora intestinal do homem. (22)

Embora ainda que muito raramente, *S. aureus* que era resistente à vancomicina, anteriormente um antibiótico de último recurso, foi isolado no Japão e nos Estados Unidos. Apesar das estratégias com os potentes antibióticos e o controlo da infecção hospitalar, *S. aureus* continuou a ser o principal patogénico humano. (29)

Para o doente, o potencial impacto do MRSA abrange o aumento da morbidade e da mortalidade. Este impacto inclui uma resposta mais lenta à terapêutica e elevados riscos de falência terapêutica, procedimentos suplementares e tratamentos (tais como drenagem da ferida cirúrgica), internamentos mais prolongados, maior absentismo ao trabalho, demora em regressar as actividades normais e diminuição da qualidade de vida. Dentro dos hospitais, o MRSA pode conduzir ao aumento do custo do controlo da infecção, do uso laboratorial para vigilância e raio-X, uso de terapêutica empírica de espectro mais amplo, e internamentos mais prolongados. Pode ter impacto nos períodos de espera no hospital para novas admissões e dá origem ao uso de terapêuticas mais dispendiosas e ao aumento global da taxa de infecção estafilocócica. (29)

Adicionalmente, os estudos de doentes com *S. aureus* metilino-resistentes reportaram taxas de mortalidade mais elevadas, aumento da morbidade, internamentos mais prolongados e custos mais elevados em comparação com doentes com *S. aureus* metilino-sensíveis. (29)

Vancomicina e teicoplanina são antibióticos glicopéptido(s) usado no tratamento de infecções do SARM. Teicoplanina é uma substância estrutural, congénere à vancomicina que tem uma actividade de espectro similar, mas com uma maior duração média ($t_{1/2}$). Ambas as drogas têm uma absorção oral lenta, por isso são administradas

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

endovenosamente para infecções no organismo (sistema), com a excepção da Colite pseudomembranosa onde a vancomicina pode ser administrada oralmente. (29)

Os antibióticos utilizados ainda hoje para tratar infecções provocadas pela super bactéria são administrados de forma intravenosa principalmente para acção rápida. São antibióticos glicopeptídicos que são administrados a partir das variações do estágio das infecções. Essa bactéria que já provocou milhares de mortes provoca em maioria infecções sanguíneas. (15)

Alguns tipos de alfa e beta hemolisinas induzem mudanças pró-inflamatórias nas células, inactivam o sistema imune por efeito citotóxico directo, e degradam tecidos. A alfa-hemolisina produzida por estafilococos é muito activa contra eritrócitos de algumas espécies animais. Esta toxina apresenta acção necrosante em pequenos vasos e aparentemente induz a formação de poros, alterando a permeabilidade da membrana celular. As hemolisinas estafilocócicas beta, gama e delta apresentam menor toxicidade, mas os seus mecanismos de actuação ainda não foram esclarecidos. (4)

Por outro lado, a leucocidina apresenta acção destrutiva direccionada a neutrófilos e macrófagos, permitindo que *S. aureus* escapem ilesos da fagocitose. (4)

A enzima hialuronidase provoca lise do ácido hialurônico, que compreende boa parte da matriz extracelular do tecido conjuntivo e facilita a disseminação dos microrganismos através dos tecidos. A enzima catalase, também produzida por *S. aureus*, promove a conversão do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio. O peróxido de hidrogénio é gerado pelo organismo como mecanismo de lise bacteriana. (22)

A produção leiteira vem se baseando principalmente na terapêutica alopática, e o aumento do uso de antibióticos ocorre em função da persistência de certos microrganismos resistentes. Entre eles, o *S. aureus* é um dos mais patogénicos e causa uma infecção geralmente crónica diminuindo gradualmente a produção leiteira, sendo de difícil controlo uma vez que apresenta geralmente resistência à penicilina e outros antibióticos. (22)



“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Nos últimos anos, verificou-se um aumento significativo no desenvolvimento de métodos genéticos para detecção e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. (22)

As indústrias alimentares tiveram um papel muito relevante no estudo da capacidade de algumas linhagens de *S. aureus* produzirem enterotoxinas termoestáveis que causam intoxicação alimentar, uma das mais prevalentes causas de gastroenterites no mundo inteiro, por isso, a detecção de enterotoxinas é epidemiologicamente essencial. (18)

As enterotoxinas estafilocócicas podem ser rotineiramente detectadas pelo método ELISA, imunodifusão, radioimunoensaio e aglutinação em látex, mas a viabilidade destes métodos é usualmente limitada a testes comerciais para SEA, SEB, SEC, SED e SEE. Além disso, a sensibilidade e especificidade desses métodos dependem sempre da obtenção de quantidades detectáveis de toxinas e podem variar significativamente com a pureza dos reagentes. Esses testes levam de 3 a 24 horas para cada detecção, com sensibilidade de 0,25-1,0 ng/mL havendo ainda a possibilidade de resultados falso-positivos. (22)

Métodos baseados na amplificação de ADN (PCR) podem demonstrar a presença de linhagens de *S. aureus* toxigênicas, antes da expressão das toxinas, com base nas sequências específicas dos genes e desta forma detectarem a fonte potencial de contaminação. (22)

A vantagem dos métodos baseados, relaciona-se com a capacidade de determinar de produção das toxinas estafilocócicas inclusive a partir de alimento tratado termicamente, em virtude do ADN permanecer inalterado, demonstrando o potencial de toxigenicidade de *S. aureus*. (22)

Devido às informações sobre a sequência de ADN das enterotoxinas estafilocócicas a PCR torna-se um método para a detecção dos genes destas toxinas, mostrando-se uma técnica simples e reprodutível, funcionando como uma ferramenta genética para estudos epidemiológicos. Métodos baseados em PCR (Figura 8) para determinar a ocorrência de

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

microrganismos patogénicos e toxigénicas em alimentos são amplamente reconhecidos como capazes de diminuir o tempo de detecção e aumentar a especificidade e sensibilidade dos resultados. (3)

Vários *S. aureus* isolados podem ser testados tendo em conta a sua capacidade de produção de enterotoxina, em casos onde sintomas típicos de intoxicação são observados. A contínua identificação de novas enterotoxinas estafilocócicas e o requerimento de métodos rápidos na investigação de intoxicações alimentares têm levado ao desenvolvimento de técnicas para pesquisa de um único gene, como a PCR-Uniplex e detecção simultânea dos genes *se*, como a PCR-Multiplex. A PCR-Multiplex é uma variação da técnica de PCR, onde se utilizam vários pares de iniciadores específicos para diferentes sequências alvo, numa mesma reacção de amplificação. (3)

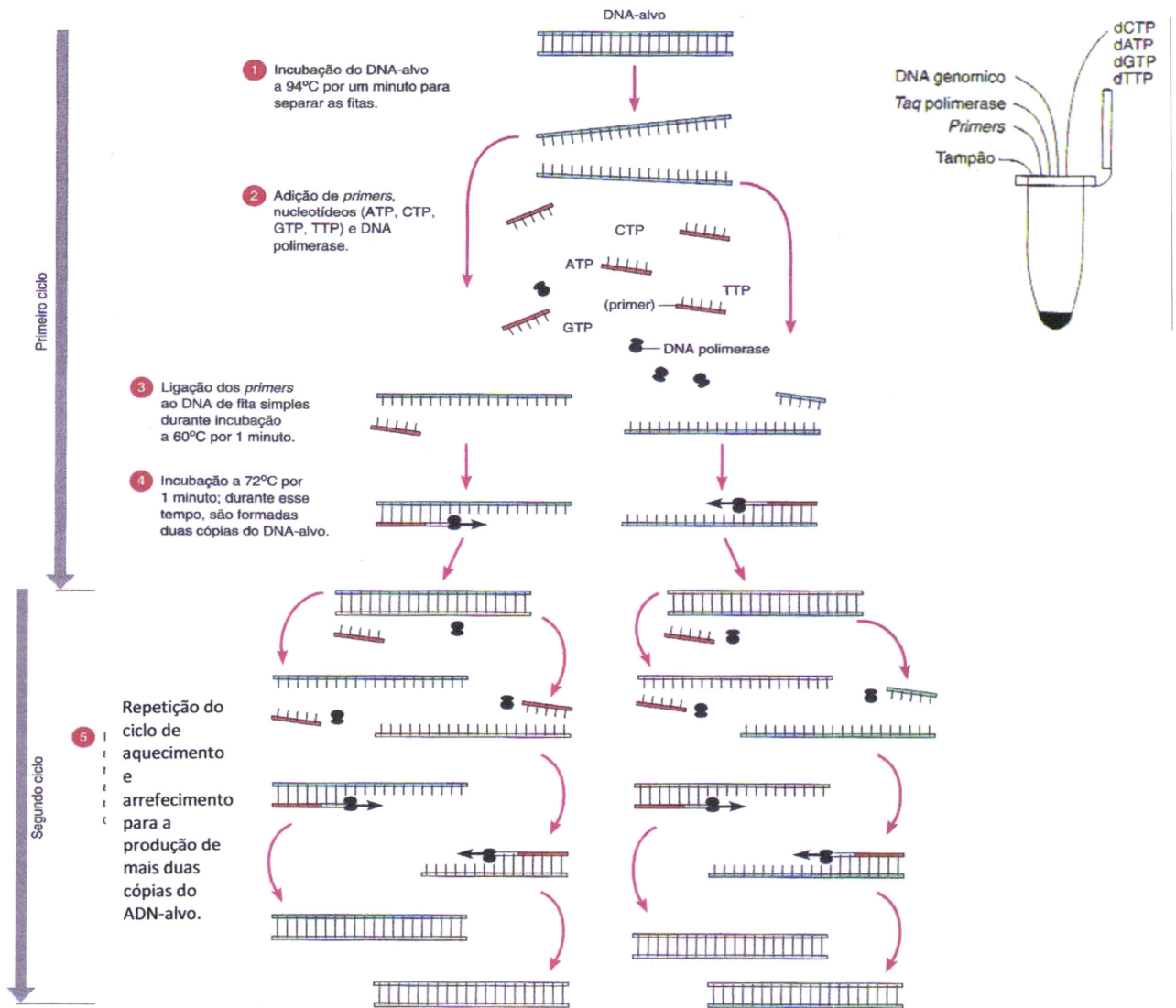
Diversos sistemas de PCR-Multiplex foram desenvolvidos para o estudo do perfil dos genes toxigénicos que economizam tempo e trabalho para detectar muitos genes simultaneamente. Este procedimento permite que várias sequências de uma mesma molécula de ADN sejam lidas, ou ainda, que múltiplos factores de virulência de um mesmo patogénico sejam pesquisados.

A técnica de PCR-Multiplex é utilizada para investigar diferentes genes toxigénicos em isolados de *S. aureus*, obtidos de quadros de intoxicação alimentar, de leite e queijo. A PCR é apenas capaz de confirmar a existência dos genes isolados de *S. aureus*, não conseguindo determinar a expressão dos mesmos. A técnica da Reacção em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa (RT-PCR “Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction”) oferece uma maneira rápida, versátil e sensível de se analisar a expressão de um gene-alvo, utilizando o ARNm como molde para a síntese de ADNc obtido pela acção da enzima transcriptase reversa. (3)

Figura 8 - Esquema da Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR).

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Fonte: Tortora *et al.* (2000).



Staphylococcus aureus compete mal com outras bactérias, logo é pouco provável que cause intoxicações após a ingestão de alimento cru, uma exceção é o leite, que é um alimento cru, mas que a presença de *Staphylococcus aureus* é devido à contaminação por mastites, ou seja, pelo facto do animal estar doente, pois os níveis de *Staphylococcus* são muito elevados. *Staphylococcus aureus* é facilmente destruído pelo processo de cozedura, no entanto, a toxinas produzidas pelo organismo sobrevivem. As toxinas conseguem sobreviver aos processos de esterilização usados em comidas enlatadas pouco ácidas. As intoxicações alimentares provocadas por *Staphylococcus aureus* ocorrem mais frequentemente, quando a comida cozinhada é contaminada pelo manipulador, e se esta

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

comida for guardada durante muitas horas a uma temperatura entre 20°- 40° C. Por exemplo, o pastel de nata, carnes cozidas, por exemplo fiambres, mariscos e outros pratos antes de consumir, são mais susceptíveis. Produtos como queijos, salsichas e salames podem fermentar incorrectamente deixando *Staphylococcus aureus* a crescer e formar toxinas durante a maturação. Este organismo é resistente á secagem e pode crescer e produzir enterotoxinas em produtos com uma a_w baixa, com cerca de 0,85. Resumidamente, os factores que influenciam o crescimento e produção de enterotoxinas são, o pH, temperatura e a_w . O crescimento de *Staphylococcus aureus* pode ocorrer em entre os 4°C- 48°C, quando a temperatura óptima de crescimento é entre os 37°C, cresce num intervalo de pH entre 4 a 10, sendo o valor de pH óptimo 6-7. Cresce num intervalo valores de actividade da água (a_w) de 0.83- \geq 0.99, sendo o valor óptimo de 0.98. Este microrganismo pode crescer em ambientes anaeróbios e aeróbios, sendo o ambiente óptimo de crescimento o aeróbio. Em relação às condições favoráveis à produção de toxinas, sabe-se que a temperatura óptima de produção é entre os 40°C-45°C, podendo no entanto ocorrer entre os 10°C- 48°C. Os valores óptimos de pH situam-se entre 4,5-9,6 (em ambiente aeróbio) ou entre 5-9,6 (em ambiente anaeróbio), sendo o valor óptimo entre 7-8. Os valores de a_w situam-se entre 0,87-> 0,99 (em ambiente aeróbio) ou entre 0,92-> 0.99 (em ambiente anaeróbio), sendo o valor óptimo de produção 0.98. A atmosfera ideal para a produção de toxinas é a aeróbia. (15)

Efeitos dos factores condicionantes de crescimento, efeitos intrínsecos, extrínsecos e implícitos:

Staphylococcus aureus é muito resistente ao processo de congelação e de descongelação e pode sobreviver plenamente em comidas armazenadas a temperaturas inferiores a 20°C. A temperatura de -10° a 0° C, a sua viabilidade decresce bastante a durante o processo de congelação. A enterotoxina é estável durante a congelação. (15)

O crescimento da toxina é óptimo entre 35°C a 40°C, com limites de crescimento ocorrem entre 7 °C a 48°C. Aos 10°C o seu desenvolvimento é muito lento (demoram mais de 20h). A temperaturas mais baixas o desenvolvimento é limitado por pequenas reduções a_w ou pH e é mais reduzido pela armazenagem em condições anaeróbicas. (15)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Em alimentos refrigerados, como por exemplo, natas, leite frango entre outros, devido às temperaturas a que estes produtos se encontram, por volta dos 6°C-7°C, as temperaturas são baixas, promovendo uma multiplicação muito lenta e o tempo necessário para que se obtenha um número suficiente de microrganismos para produzirem concentrações detectáveis de toxina é maior do que o tempo que estes permanecem armazenados à maioria dos alimentos refrigerados. (12)

O organismo é usualmente e rapidamente morto à temperatura utilizada na pasteurização e processo de cozedura dos alimentos, a resistência é superior em alimentos secos e gordos, como por exemplo, leite, feijão, ervilhas, massas, salsichas não fermentadas e carne moída. Todas as enterotoxinas são extremamente resistentes ao calor e podem sobreviver ao processo de esterilização utilizado em comidas enlatadas pouco ácidas. Depois do tratamento térmico a actividade tóxica pode resistir, pode continuar quando não há actividade serológica. O tratamento das enterotoxinas debilitadas pelo calor é feito com ureia de forma a restaurar a actividade serológica. A resistência das células ao calor é afectada pelas condições de crescimento e a resistência é aumentada pela subida das temperaturas (superiores a 37°C) e reduzida por temperaturas mais baixas (20°C). (15)

Staphylococcus aureus é facilmente morto pela radiação ionizada e não ionizada. A resistência é mais elevada em alimentos do que em soluções tampão. As enterotoxinas são muito resistentes a esta irradiação e não são destruídas pelo aumento dos níveis de irradiação utilizada no tratamento de alimentos. (15)

Um tratamento térmico subletal reduz a tolerância do microrganismo ao sal (à concentração de (NaCl)). (12)

Staphylococcus aureus é um microrganismo que tolera o sal e cresce a uma actividade da água tão baixa, chega a valores de 0,85 para além de outras condições óptimas de crescimento. Contudo o seu crescimento é algumas vezes limitado elevada actividade da água, por acção de humidificantes. A produção de enterotoxinas ocorrem debaixo de

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

níveis mais estreitos do que o próprio crescimento, exemplo, a produção da enterotoxina A pode ocorrer com menos actividade da água do que a enterotoxina B. (15)

Por outro lado, as condições óptimas, *Staphylococcus aureus* pode crescer com pH entre valores inferiores a 4,3, com um ácido inorgânico como HCl, funciona como acidificante. Contudo, na presença de ácidos orgânicos os limites do pH são muito mais altos. (15)

De acordo com a bibliografia consultada, existe pouca informação sobre o efeito dos conservantes. Apenas existe uma pequena indicação de que alguns conservantes, como um gás, etil-4-hidrogéneobenzoato, pode afectar negativamente a produção e não o crescimento. (15)

Staphylococcus aureus cresce tanto com oxigénio como sem oxigénio, mas geralmente cresce mais devagar em condições anaeróbicas. Em contraste, a sobrevivência das células pode ser aumentada em condições anaeróbicas quando comparadas com as condições aeróbicas. (15)

Staphylococcus aureus é facilmente morto pelos desinfectantes vulgarmente utilizados no processo de higienização. Grau de eficiência depende do tipo de desinfectante. (15)

Efeito da competição *Staphylococcus aureus*:

O efeito de vários organismos no crescimento de *Staphylococcus aureus* é muito complexo, é difícil distinguir entre efeitos devido à produção de metabolitos com ácidos específicos, com baixo pH, destruição de nutrientes e a produção de factores anti *Staphylococcus*. Os efeitos dos adversários no controlo do crescimento do *Staphylococcus aureus* e na produção de enterotoxinas depende do rácio de competição entre as células, o tipo de adversário, a temperatura de armazenagem e crescimento de substratos. O efeito dos adversários é variável entre organismos e estirpes. (15)

Outros tipos de bactérias, presentes nos alimentos podem competir com *Staphylococcus aureus* e podem reprimir a sua multiplicação o suficiente para retardar ou impedir a

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

produção de toxinas podendo até transformá-lo em alimento antes que este se torne perigoso. (12)

A eficácia desta representação depende do número de microrganismos que estão a competir com o estafilococo, do tipo de alimento, da temperatura e do tempo. (12)

Normalmente, os estafilococos penetram o alimento em escassas quantidades e são superados em número pelas bactérias que competem com eles nos alimentos frescos. (12)

No entanto, é possível que os alimentos tenham sido submetidos a tratamento térmico, logo com a destruição de alguns competidores, esta competição pode não existir, razão pela qual é possível haja multiplicação de estafilococos, sem restrição. (12)

Sumário dos factores importantes ao desenvolvimento de *Staphylococcus aureus*:

Staphylococcus aloja-se mais frequentemente na pele e nas membranas mucosas de animais com sangue quente, mas o maior produto de estirpes de enterotoxinas é o Homem. (15)

A contaminação de alimentos pode ocorrer como resultado de higienizações deficientes em qualquer parte da cadeia alimentar. Tudo isto combinado com temperaturas de armazenagem e durante períodos que permitam o crescimento significativo de *Staphylococcus*, e conseqüente produção de enterotoxinas que provocam intoxicações alimentares. Então o controlo é feito através da protecção dos produtos, de forma a evitar a contaminação e evitar e controlar as condições ou factores de crescimento da enterotoxina. (15)

Com respeito a produtos que são manipulados, que envolvam temperaturas óptimas para o desenvolvimento de *Staphylococcus*, por exemplo, na produção de queijo, enchidos e salsichas fermentados, é muito importante efectuar o controlo das matérias-primas, tal como, as fases de maturação e fermentação. (15)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

As células de *Staphylococcus*, são facilmente mortas pelo calor, mas são resistentes ao sal e podem estar presentes em produtos que contêm sal ou em produtos com baixa actividade da água. (15)

Estes organismos são muito resistentes à secagem e sobrevivem bem em quase todas as condições ambientais e por isso podem resistir em áreas de produção alimentar, durante longos períodos, onde podem actuar como fonte de contaminação para produtos que não estão propriamente protegidos. (15)

As enterotoxinas são produzidas em várias condições ambientais e em várias condições de armazenagem. Estas são muito resistentes ao calor e podem sobreviver aos processos de cozedura e de esterilização. (15)

Contaminação e Deterioração de Alimentos:

A deterioração de alimentos constitui um problema significativo, na medida em que, as quantidades de alimentos que são destruídos diariamente são muito elevadas. A principal causa de contaminação e consequente deterioração dos nossos alimentos é a proliferação de microrganismos que os contaminam. (10)

A deterioração pode ter diversas origens:

- ☉ Ataques de insectos ou roedores;
- ☉ Acção de agentes físicos (gelo, esmagamento durante a colheita ou o transporte, murchar por desidratação...);
- ☉ Deteriorações químicas não enzimáticas (escurecimento, rancificação dos lípidos por oxidação, envelhecimento do pão ou bolos);
- ☉ Alterações devidas às enzimas dos próprios alimentos (amolecimento exagerado por autólise das frutas e escurecimento enzimático);
- ☉ Alterações de origem microbiana.

É evidente este último aspecto será desenvolvido ao longo desta dissertação. Uma intervenção controlada de determinados microrganismos nos alimentos pode dar origem a

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

modificações desejáveis. Mas com maior frequência, as mudanças de origem microbiana levam a uma deterioração (ou, seja, perda de elementos nutritivos, perda de textura, alterações nos tecidos, sabor e odor desagradáveis, entre outros) que torna o produto impróprio para o consumo humano em maior ou menor espaço de tempo. Esta é a consequência da sua actividade natural de decomposição, visto que os microrganismos atacam com igual vigor os nossos alimentos e os detritos vegetais e animais. (10)

As alterações de origem microbiana revestem-se de especial importância, porque, por um lado, trata-se de um tipo de deterioração mais frequente na armazenagem, levando a perdas económicas consideráveis, e por outro lado, porque também dizem respeito à *saúde pública*, visto que determinados microrganismos podem multiplicar-se ou segregar substâncias tóxicas nos alimentos. (10)

Excepto os alimentos esterilizados, todos os alimentos, mesmo os de excelente qualidade, são susceptíveis de conter microrganismos: formam a **flora de contaminação**. (10)

Para prevenir ou retardar as deteriorações de origem microbiana, devem ser tomadas precauções em todas as etapas de manipulação e de tratamento dos géneros alimentícios, poder-se-á assim minimizar o contacto dos microrganismos com os alimentos (prevenção da contaminação) e ajustar as condições de armazenamento de tal forma que reduzam a velocidade de proliferação. Além disso, podem-se submeter os alimentos a diferentes tratamentos para eliminar, parcial ou totalmente, a microflora presente (métodos de conservação). (10)

Para aplicar estas diversas medidas o mais eficazmente possível, é primordial conhecer, em primeiro lugar, a origem e a natureza da microflora presente nos diferentes tipos de alimentos, assim como os factores relacionados com a proliferação dos agentes de alteração. (10)

Os microrganismos presentes sobre ou nos alimentos podem ter várias origens, as microfloras naturais do solo, da água, do ar, dos próprios alimentos, assim como os microrganismos introduzidos durante a manipulações. (10)

Os microrganismos contaminantes (*Staphylococcus aureus*) são introduzidos nos alimentos, durante a sua manipulação. Os equipamentos e os utensílios que entram em contacto com os alimentos, assim como os operadores que os manipulam, originam uma contaminação adicional, o que diversifica a microflora presente e aumenta o número total de germes. (10)

A amplitude destas contaminações depende directamente do nível de higiene e das precauções tomadas em todas as etapas, desde a colheita ou o abate até ao tratamento final. A limpeza dos locais que servem para armazenamento e tratamento dos produtos, a frequência e a qualidade da limpeza dos equipamentos, dos utensílios e das áreas de trabalho, o nível de higiene dos operadores são factores de uma importância extrema. (10)

Tendo-se em vista que os microrganismos aderem facilmente aos materiais, o contacto dos alimentos com as superfícies mal higienizadas (áreas de trabalho, paredes e utensílios, entre outras) aumentam consideravelmente a sua carga microbiana. As máquinas e os seus acessórios (misturador, picadoras de carne, descascadores e etc.) são inevitavelmente, fontes de contaminação, que devem ser limpos, higienizados e desinfectados frequente e perfeitamente, pois se assim não for, as partículas de comida que neles permanecem constituem meios favoráveis para a multiplicação microbiana. É o que acontece com os utensílios, como por exemplo, facas, tábuas para corte, pinças e etc. e com os recipientes. (10)

A contaminação efectuada pelos operadores que manipulam os alimentos (certos autores consideram que uma pessoa pode espalhar à sua volta cerca de 1000 a 10000 germes por minuto, um dos quais, o *Staphylococcus aureus* potencialmente patogénicos), assim como os animais, os seres humanos possuem floras normais e contaminantes sobre a pele, nas vias respiratórias e digestivas. Podem-se contar, por exemplo, aproximadamente um milhão de bactérias por centímetro quadrado na garganta, no nariz e nas orelhas, enquanto um grama de fezes contém vários biliões. É evidente que uma pessoa com uma higiene corporal deficiente, contamine muito mais os alimentos quando os manipula, do

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

que uma pessoa cuidadosa. É por esse motivo que é extremamente importante educar os operadores a manterem hábitos adequados de higiene e deve-se impor regras de higiene nas empresas alimentares. (10)

Do ponto de vista da saúde pública, o papel dos operadores claramente evidenciado, como uma “fonte” de intoxicações alimentares. Como foi referido anteriormente, as pessoas são portadoras de germes patogénicos que disseminam em todos os alimentos que manipulam. Podem se apresentar 3 casos: (10)

☛ Pode tratar-se de uma pessoa que sofre temporariamente de uma doença contagiosa, de uma gastroenterite ou de uma ferida infectada.

☛ Noutros casos, as pessoas estão de boa saúde, mas possuem germes patogénicos na sua flora, ou seja, são portadores. Patogénicos, como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, existentes na flora nasal, ou *Salmonella* na flora intestinal. Os portadores são responsáveis por numerosos casos de intoxicações alimentares.

☛ Os operadores podem servir como vectores dos agentes patogénicos. Com efeito, as mãos contêm sempre germes patogénicos após a manipulação de alimentos contaminados. Estudos demonstram que as bactérias, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, são com bastante frequência, detectadas nas mãos dos trabalhadores de indústrias alimentares. Para minimizar este efeito é extremamente importante evitar manipular sucessivamente, sem lavagem das mãos, aves e carnes cruas e logo em seguida alimentos cozinhados (contaminação cruzada). (10)

Factores ligados à deterioração dos alimentos

A deterioração de um alimento é geralmente consequência do crescimento maciço e da actividade bioquímica de apenas um pequeno número de espécies microbianas, embora haja uma flora inicial de contaminação frequentemente diversificada. (10)

Para prever a evolução da flora contaminante microbiana num alimento, é necessário tomar em consideração numerosos factores. Alguns deles, qualificados como **factores intrínsecos**, correspondem às características físico-químicas do próprio alimento enquanto outros, os **factores extrínsecos**, têm em conta as condições ambientais onde são

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

mantidos os alimentos. Estes diferentes factores exercem uma selecção inicial sobre a flora contaminante, favorecendo determinadas espécies em relação a outras. As espécies favorecidas crescem mais rapidamente do que as outras, o que garante a sua dominância, e as suas actividades metabólicas específicas modificam progressivamente o meio. Irão formar a *associação microbiana de alteração* ou, de uma forma mais simples a **flora de alteração**. (10)

Os diferentes tratamentos a que é submetido um alimento durante o seu acondicionamento (tratamento térmico, congelação, irradiação, adição de conservantes químicos) modificam igualmente, quantitativa e qualitativamente, as populações microbianas presentes e as características do produto. Os alimentos tratados apresentam portanto uma evolução frequentemente muito diferente dos alimentos frescos. (10)

Factores intrínsecos

As características físico-químicas de um alimento, ou factores intrínsecos, têm uma acção preponderante sobre a composição da flora de alteração. Com efeito, um produto alimentar constitui para um microrganismo um meio mais ou menos propício ao seu desenvolvimento. Sabemos que cada tipo de microrganismo tem exigências bem precisas, tanto do ponto de vista das condições físico-químicas como do ponto de vista nutricional. Quanto mais as características de um alimento se afastam das exigências óptimas de um microrganismo, mais retardado é o crescimento deste. Em consequência, entre as diversas espécies presentes, aquelas cujas exigências correspondem melhor às características deste alimento são por isso mais favorecidas. O próprio alimento tem um efeito selectivo sobre a sua flora microbiana. Assim, um sumo de frutas, devido á sua acidez, só permite um crescimento muito lento das bactérias, enquanto as leveduras podem nele reproduzir-se rapidamente. (10)

Os principais factores intrínsecos que influenciam o crescimento dos microrganismos são o *pH*, a disponibilidade em água, o potencial de oxirredução e os nutrientes disponíveis. (10)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

‡ pH

Já sabemos que o desenvolvimento de um microrganismo só pode ocorrer dentro de uma determinada faixa de *pH*. O *pH* ótimo para uma espécie é aquele em que o microrganismo apresenta o crescimento mais rápido. Quanto mais o *pH* de um alimento se afasta desse valor ótimo, mais o desenvolvimento do microrganismo se desacelera. O *pH* mínimo marca o limite inferior, e o *pH* máximo o limite superior, antes da interrupção total do crescimento. (10)

A zona de tolerância de *pH* na qual o crescimento de uma determinada espécie é possível de um lado e do outro do *pH* ótimo varia, no entanto, consoante os outros factores do meio. É mais ampla quando todos os outros factores estão nos seus níveis ótimos, mas é mais reduzida no caso inverso. Assim, a tolerância de um microrganismo á acidez será mais pequena se um ou vários factores – a disponibilidade da água, por exemplo, se estiverem a um nível menos favorável. (10)

A maioria das bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus* tem um *pH* ótimo próximo da neutralidade (6,5 a 7,5) e o seu desenvolvimento é consideravelmente desacelerado, quando não interrompido, a um *pH* inferior a 4,5 ou superior a 9. (10)

O *pH* afecta não só a taxa de crescimento do microrganismo, mas igualmente a sua taxa de sobrevivência durante o armazenamento e os diferentes tratamentos de conservação. Algo que é muito importante e conservaria, a termorresistência dos esporos bacterianos é reduzido em meio ácido. O *pH* de um alimento é portanto um factor primordial para determinar para determinar a amplitude do tratamento térmico a que deve ser submetido para ser posto em conserva. (10)

Além da medida do *pH*, é importante conhecer a natureza das substâncias responsáveis pela acidez de um produto alimentar. Com efeito, os ácidos orgânicos têm propriedades inibidoras importantes, mas variáveis de um tipo a outro. Assim, para um mesmo *pH*, o ácido acético é mais eficaz do que o ácido láctico, ele próprio mais eficaz que o ácido cítrico ou determinados ácidos inorgânicos (ácido fosfórico, ácido clorídrico). Em

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

consequência, o *pH* mínimo de crescimento será mais elevado com certos ácidos orgânicos do que com outros. (10)

Os alimentos apresentam um poder tampão mais ou menos significativo face às modificações do seu *pH*. As proteínas, por exemplo, são compostos que se opõem às variações de *pH*. É por isso que os alimentos ricos em proteínas (carnes, ovos, leite...) são mais difíceis de acidificar do que as frutas e os legumes. (10)

O *pH* dos diferentes tipos de produtos alimentares varia, o que exerce efeitos selectivos divergentes sobre a flora de contaminação. De facto, carnes, peixes e frutos do mar, leite e legumes apresentam *pH* compatíveis com o crescimento da maioria das bactérias, leveduras e bolores. Nestes produtos, as bactérias tendem a dominar na flora de alteração se os outros factores lhes são favoráveis. (10)

Para um mesmo tipo de produtos alimentares, uma variação de *pH*, mesmo ligeira, influencia a sua duração de conservação. Com efeito, é preciso lembrar que o período de latência dos microrganismos aumenta e que a velocidade de crescimento diminui à medida que estes se afastam das condições óptimas. Assim, uma carne que apresenta um *pH* de 5,5 conserva-se mais facilmente do que aquela cujo *pH* está próximo de 6,5. (10)

Contrariamente á maioria dos produtos alimentares, que têm um *pH* neutro ou ácido, as claras de ovos são alcalinas. A clara fresca tem um *pH* ligeiramente alcalino (7,6), mas este eleva-se rapidamente durante a armazenagem por perda do CO₂ dissolvido (até 9,0 ou 9,5). Esta alcalinização contribui para facilitar a conservação dos ovos. (10)

Os alimentos fermentados (chucrute, marinados, queijos, iogurtes, entre outros) são habitualmente mais ácidos do que as suas matérias-primas por causa da acumulação de ácidos orgânicos durante a fermentação. Isto facilita a sua conservação. A prática de conservar os ovos, legumes, carnes ou peixes em vinagre é uma outra forma de diminuir o *pH* destes produtos, e portanto de lhes prolongar a conservação. (10)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

A maioria dos microrganismos, crescem melhor em pH próximo da neutralidade (6,5 a 7,5). (28)

Os microrganismos apresentam valores de pH, mínimo, ótimo e máximo para multiplicação. (28)

Faixa de crescimento da maioria das bactérias situa-se entre valores de pH ótimo entre 6,5 a 7,5, registam-se valores de pH máximo entre valores próximos de 9,0 e o pH mínimo é entre valores de 4,5. (28)

Os bolores possuem maior tolerância a valores baixos de pH, seguem as leveduras e por fim as bactérias. (28)

Microrganismos patogénicos, assim como *Staphylococcus aureus*, apresentam uma faixa de pH mais estreita. (28)

O tipo de ácido, presente num alimento, influencia a tolerância do *Staphylococcus aureus* ao pH. (28)

Podemos enumerar alguns efeitos dos ácidos no microrganismo (*Staphylococcus aureus*), nomeadamente, maior gasto de energia para manter o pH intracelular, desnaturação de proteínas, ADN, alteração da actividade das enzimas responsáveis pelas actividades vitais da célula, menor velocidade de crescimento. (28)

Exemplos do pH de alguns alimentos: (28)

Alimento	pH
Carne	5,5 – 6,2
Frango	6,2 – 6,4
Peixe	6,6 – 6,8

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Leite	6,3 – 6,5
Clara de ovo	9 -10
Tomate	4,2 – 4,3
Maçã	2,9 – 3,3
Banana	4,5 – 4,7
Milho	7,3
Alface	6,0
Cenoura	4,9 –6,0

☞ **Actividade da água (A_w)**

O teor em água de um alimento é outro factor importante que determina a facilidade com a qual os diferentes microrganismos nele podem crescer, e consequentemente alterá-lo. Com efeito, todos os microrganismos só se podem desenvolver num substrato onde encontrem uma quantidade suficiente de água para o seu funcionamento. É por isso que os produtos alimentares desidratados se conservam tão facilmente. (10)

Mais exactamente, é a quantidade de *água livre* de um produto alimentar que deve ser considerada mais do que a quantidade de água total. Com efeito, uma fracção mais ou menos importante da água contida num alimento está ligada aos iões e às moléculas orgânicas e não está acessível aos microrganismos. Os solutos, (particularmente os açúcares e os sais) e os colóides hidrófilos (proteínas, amido, géis) retêm com mais ou menos força as moléculas de água que lhes estão próximas. Esta *água ligada* é inacessível aos microrganismos. É por isso que um produto alimentar salgado, açucarado ou gelificado terá menos água livre do que um alimento fresco do mesmo tipo. (10)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

A água no seu estado cristalizado (gelo) também não pode ser utilizada pelos microrganismos. Num alimento congelado, a disponibilidade em água é muito reduzida porque, além da água cristalizada, uma parte da água líquida restante está ligada aos solutos que nela estão concentrados. A disponibilidade em água de um produto alimentar é representada pela sua *actividade de água* (a_w). (10)

A *actividade* da água de um alimento é sempre inferior a 1,00, pois tem sempre uma proporção mais ou menos importante da sua água sob forma “ligada”. Evidentemente, quanto mais importante for a proporção relativa de solutos, mais fraca é a a_w do produto. Verifica-se que, a *actividade* da água é inversamente proporcional á pressão osmótica do alimento. (10)

Um alimento que tem uma a_w baixa é pouco propício ao desenvolvimento dos microrganismos e pode até levar a uma **plasmólise** das células microbianas. Assim, uma bactéria pode perder metade da sua água intracelular quando a a_w passa de 0,995 a 0,950. Este fenómeno inibe a *actividade* enzimática e desacelera o crescimento. Determinados microrganismos, entre os quais os *Staphylococcus aureus*, são capazes de se adaptar a a_w inferior a 0,95 por diferentes mecanismos fisiológicos. Mas esta capacidade de adaptação tem os seus limites. Qualifica-se como a_w mínimo o limite inferior para além do qual o crescimento não é visível. (10)

As exigências mínimas em água variam com as espécies (e até entre as diferentes estirpes de uma mesma espécie). De maneira geral, as bactérias suportam menos bem uma redução da a_w do que as leveduras e os bolores. Para a maioria das bactérias, valores de a_w inferiores a 0,98 marcam já uma desaceleração do crescimento. Assim, a bactéria *Staphylococcus aureus* cresce apenas 10 por cento da sua velocidade máxima a uma a_w de 0,90, mesmo que o seu crescimento seja possível até 0,86. (10)

Os produtos alimentares de a_w fraca ($< 0,85$) como as farinhas, o peixe salgado ou as geleias muito doces, são pouco susceptíveis de ser alteradas por bactérias. Quando a quantidade de água não é limitante, (a_w de 0,99 ou 0,98), as bactérias são favorecidas porque a sua taxa de crescimento é mais elevada. A *actividade* da água exerce portanto,

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

assim como o pH, uma forte influência sobre a selecção dos microrganismos susceptíveis de alterarem um alimento e sobre a duração da sua conservação. (10)

Do ponto de vista sanitário, é interessante notar que a produção de toxinas bacterianas e de micotoxinas requer uma disponibilidade em água mais elevada do que a necessária para o crescimento. Assim, o crescimento de uma espécie toxígena num alimento não implica automaticamente a presença da toxina. (10)

A a_w dos alimentos varia entre 0,99 e 0,20. (10)

‡ Potencial de Oxirredução (POR)

O potencial de oxirredução é a medida do poder oxidante ou redutor de um meio, ou seja, a sua tendência para receber ou dar electrões. O POR de um produto alimentar tem um efeito selectivo sobre a flora contaminante: os produtos de POR elevado (portanto oxidantes) favorecem os aeróbios, enquanto os produtos de baixo potencial (redutores) favorecem os anaeróbios. No entanto, o potencial crítico a partir do qual o crescimento é permitido varia consideravelmente conforme as espécies em cada um dos dois grupos. O potencial de oxirredução assim como a presença ou não de oxigénio livre, influenciam igualmente a natureza das reacções metabólicas que dominarão num alimento; respiração ou fermentação dos glícidos, digestão ou putrefacção das proteínas, etc. (10)

O potencial de oxirredução de um alimento é geralmente medido em milivolts (mV) e exprime-se numa escala Eh, um substrato oxidante tem um Eh positivo, enquanto um meio redutor apresenta um Eh negativo. Muitos aeróbios estritos exigem potenciais superiores a + 200 mV, enquanto certos aeróbios estritos pedem potenciais inferiores a - 200 mV. (10)

O potencial de oxirredução de um alimento natural depende das suas características bioquímicas (factor intrínseco) e do teor em oxigénio do ar ambiente (factor extrínseco). Sob a superfície, vários alimentos apresentam um Eh negativo devido ao seu alto teor em compostos redutores (açúcares redutores, ácido ascórbico, proteínas, aminoácidos com enxofre, diferentes compostos que possuem radicais). É por isso que o crescimento de

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

germes aeróbios estritos nesses produtos está muitas vezes limitado á zona superficial, ali onde o oxigénio do ar está disponível. Com efeito, o oxigénio difunde-se mal em profundidade nos meios redutores, a menos que uma estrutura porosa ou aberturas naturais (frutas e legumes inteiros) facilite a penetração do ar. Esta diferença de POR entre a superfície e o interior de um produto explica, por exemplo, uma peça de carne pode estar alterada em profundidade por um germe anaeróbio estrito enquanto a sua superfície está atacada por aeróbios. (10)

O acréscimo de determinados aditivos alimentares pode modificar o POR de um produto. Os nitritos e os antioxidantes (ácidos ascórbico, entre outros) reduzem a difusão do oxigénio e fazem baixar o POR. Inversamente, os nitratos aumentam o POR porque podem ser reduzidos em nitratos pelas bactérias aeróbias e servir de paliativo á falha de oxigénio (respiração nitrato). (10)

O teor em oxigénio do ar ambiente (PO_2 para pressão parcial de oxigénio) tem influência sobre o POR de um alimento. Embora a atmosfera seja rica em oxigénio, o ar em contacto directo com o alimento pode ter uma PO_2 fraca. As embalagens herméticas e empilhamentos de produtos alimentares são situações que reduzem a PO_2 do ar ambiente. Favorecem o crescimento dos microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos. (10)

Se a composição do ar ambiente modifica facilmente as características oxidorreduzoras da superfície de um alimento, o interior deste resiste frequentemente às variações de POR. Isto deve-se ao poder tampão de Eh de vários alimentos frescos. Este poder tampão desaparece no entanto após o cozimento. (10)

Durante o crescimento num alimento, os microrganismos fazem variar o seu POR. Nota-se frequentemente que um meio oxidante se torna rapidamente redutor como consequência do desenvolvimento microbiano. Assim, o crescimento de leveduras num sumo de frutas fresco baixa rapidamente o seu potencial de oxirredução por captação do oxigénio disponível e libertação de substâncias redutoras. O meio, tornado anaeróbio, é então propício á fermentação. (10)

☪ **Composição Química dos Alimentos**

A composição química geral de um alimento, como a natureza e as proporções dos seus compostos nutritivos, tem igualmente um efeito selectivo sobre a microflora de alteração. Existem microrganismos mais especializados, pois possuem necessidades mais específicas. Assim, os lactobacilos e *Staphylococcus aureus* devem encontrar vários factores de crescimento (vitaminas, aminoácido) num alimento para nele se desenvolverem. De forma geral, entre os microrganismos encontrados nos alimentos, os bolores formam o grupo de organismos que tem as mais fracas exigências nutricionais, seguido pelo grupo das leveduras, as bactérias de Gram negativo e finalmente as bactérias de Gram positivo. (10)

Os glícidos são a fonte privilegiada de energia para um grande número de microrganismos de alteração. No entanto, a capacidade de utilizar diversos tipos de glícidos varia de uma espécie e de uma estirpe a outra. O tipo de glícidos presente num alimento terá portanto um efeito selectivo sobre a flora de alteração. Embora a maioria dos microrganismos possa utilizar a glicose, por exemplo, um número muito mais restrito pode utilizar a lactose. Assim, as estirpes lactose mais são mais favorecidas nos produtos derivados do leite. Os alimentos ricos em amido e pobres em açúcar simples (como os cereais e as batatas) devem primeiro ser atacados por espécies capazes de segregar amilases antes de ser usados por outros microrganismos. (10)

Da mesma forma, os alimentos ricos em proteínas e pobres em glícidos (as carnes, por exemplo) são em primeiro lugar um terreno propício ao desenvolvimento das espécies proteolíticas (capazes de hidrolisar as proteínas em aminoácidos). Só as proteínas simples são habitualmente hidrolisadas (ou digeridas), porque poucos microrganismos podem atacar proteínas complexas. Um grande número de espécies, pelo contrário, é capaz de utilizar os aminoácidos como fonte de energia. (10)

☪ **Estrutura Biológica**

Os produtos alimentares frescos são frequentemente protegidos por um revestimento (concha, pele, tegumento) que retarda a penetração dos microrganismos, estes

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

contaminam a superfície, mas são raros ou ausentes na massa do produto. A casca dos ovos e das nozes, a casca das frutas, e pele e as escamas de um peixe são exemplo bem conhecidos de estruturas biológicas protectores muito eficazes. Da mesma forma, a pele e as membranas que envolvem os tecidos musculares das carcaças animais protegem eficazmente a carne, principalmente se estiver refrigerada. A organização interna dos tecidos vegetais e animais intactos, formada por células separadas por tecido conjuntivo (animais) ou por paredes celulósicas (vegetais), também é um obstáculo que limita a propagação dos microrganismos na massa do produto. (10)

Embora a longo prazo nenhuma destas barreiras impeça a alteração de um alimento, é evidente que um produto inteiro cujo revestimento natural está intacto conserva-se mais tempo e mais facilmente, nas mesmas condições, do que um produto descascado, cortado, picado ou espremido. Estas operações têm como consequência, não apenas a supressão destas barreiras e a distribuição dos microrganismos na massa do produto, mas também acelerar o crescimento destes pela libertação de líquidos celulares ricos em água e em elementos nutritivos facilmente assimiláveis, com um aumento da disponibilidade em oxigénio livre. (10)

Factores Extrínsecos

Os factores extrínsecos estão ligados às condições ambientais nas quais são mantidos os alimentos durante o seu armazenamento. São de uma importância prática considerável porque se pode facilmente intervir para modificá-los de maneira a prolongar a duração da conservação. A temperatura, a humidade, a composição do ar ambiente agem de forma determinante sobre o desenvolvimento microbiano. (10)

☞ Temperatura

A temperatura de armazenamento é o factor ambiental mais importante que afecta a duração de conservação e o tipo de alterações microbianas dos produtos alimentares. De facto, já sabemos que o ritmo de desenvolvimento de um microrganismo varia com a

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

temperatura e que além de certos limites, todo o crescimento é impossível. Teoricamente, existe uma possibilidade de alteração nos alimentos mantidos a uma temperatura compreendida entre -5°C e $+70^{\circ}\text{C}$ se as outras condições forem favoráveis. Dentro deste intervalo, no entanto, existem diferenças consideráveis quanto à rapidez, ao tipo de alteração e aos microrganismos em causa. Até uma mudança de temperatura de pequena amplitude pode ter um efeito muito positivo sobre a conservação, aumentando a fase de latência dos germes de alteração ou inibindo o desenvolvimento de um patogénico perigoso. (10)

♣ **Humidade do Ar Ambiente**

Uma humidade ambiente elevada favorece a proliferação dos microrganismos, especialmente à superfície dos alimentos. Mesmo os produtos considerados de fácil conservação pelo seu estado desidratado podem cobrir-se de bolores se a humidade ambiente for suficientemente elevada. Com efeito, num meio fechado, a humidade relativa do ar em contacto com um alimento modifica progressivamente a sua a_w . Se a humidade relativa do ar ambiente for superior à do alimento, haverá aumento da água de superfície. A sua a_w aumentará e tornar-se-á então compatível com o crescimento de um maior número de microrganismos. Um biscoito seco ou leite em pó, que se conservam normalmente sem problemas, podem ser atacados por bolores se forem colocados em atmosfera húmida. (10)

Para os alimentos frescos, a desidratação de superfície conduz frequentemente a uma deterioração física do produto (endurecimento ou até mesmo murchar). É portanto necessário manter uma humidade elevada do ar ambiente, mesmo que para isso seja necessário intervir sobre outros factores (temperatura, gases da atmosfera) para retardar o desenvolvimento microbiano. (10)

♣ **Composição da Atmosfera**

Além do vapor de água outros gases da atmosfera influenciam o crescimento da flora microbiana. Os principais são o *oxigénio* e o *gás carbónico*. O azoto intervém principalmente como gás de substituição. (10)

O teor em oxigénio do ar ambiente, ou pressão parcial de oxigénio (PO_2), influencia o potencial de oxirredução (POR) de um alimento, mas a sua influência limita-se principalmente á superfície do produto. A PO_2 elevada do ar ambiente favorece o crescimento dos microrganismos aeróbios na flora microbiana de superfície, enquanto uma redução significativa facilita a dominância dos germes anaeróbios e dos lactobacilos. Como um grande número de germes de alteração psicrófilas são anaeróbios estritos, as embalagens a vácuo contribuem para aumentar a conservação de produtos alimentares refrigerados (charcutaria, queijos, peixes e frutos do mar, legumes preparados). A flora de alteração, mais lenta em estabelecer-se, é então constituída principalmente por lactobacilos. (10)

Numerosas experiências mostraram que um teor elevado em gás carbónico (PCO_2) tem uma acção bacteriostática que lhe é própria, além do decréscimo em oxigénio que pode provocar por substituição. A sua acção sobre os microrganismos parece efectuar-se em dois níveis:

- Baixa o pH por formação de ácido carbónico após reacção com a água;
- Bloqueia a actividade de determinadas enzimas, especialmente das descarboxilases.

O seu efeito inibidor é particularmente eficaz às temperaturas de refrigeração. Age principalmente contra os bacilos de Gram negativo aeróbios e psicrófilas, e contra os bolores. O gás carbónico retarda igualmente a senescência das frutas inibindo a acção do etileno, uma hormona vegetal que acelera o amadurecimento. Por estas diferentes razões, a conservação de determinados alimentos (frutas, carnes, peixes) é melhorada sob atmosfera modificada. (10)

Os alimentos mais susceptíveis de contaminação por *Staphylococcus aureus* são, alimentos salgados e ligeiramente açucarados, carnes muito manuseadas e picadas, produtos de pastelaria, maionese, ovoprodutos, cremes gelados, produtos lácteos e alguns molhos. (26)

O controlo da saúde do manipulador, controlo da integridade das mãos, unhas e higiene individual, a necessidade de manter os alimentos susceptíveis abaixo de 4°C ou acima de

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

46°C, o facto de se submeterem os alimentos susceptíveis, a temperaturas que permitam a destruição da bactéria (temperatura de fervura) e a higienização correcta das máquinas e planos de trabalho relativos a corte, manuseamento e operações de picar carne. (26)

Legislação em Vigor:

Segundo o regulamento (CE) N.º2073/2005 da CE de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, os géneros alimentícios não devem conter microrganismos nem as suas toxinas e metabolitos em quantidades que representem um risco inaceitável para a saúde humana. Neste regulamento, no ponto 3, existe a referência ao Regulamento (CE) N.º 178/2002 estabelece requisitos gerais de segurança dos géneros alimentícios, segundo os quais não devem ser colocados no mercado géneros alimentícios que não sejam seguros. Os operadores das empresas do sector alimentar têm o dever de retirar do mercado os alimentos que não sejam seguros. A fim de contribuir para a protecção da saúde pública e evitar interpretações divergentes, é necessário estabelecer critérios de segurança harmonizados em matéria de aceitabilidade dos alimentos, designadamente no que se refere à presença de certos microrganismos patogénicos. (24)

No ponto 15, do regulamento n.º2073, em 26 e 27 de Março de 2003, o CCMVSP adoptou um parecer sobre a presença de enterotoxinas estafilocócicas nos produtos lácteos, em especial no queijo. O comité recomendou que se procedesse a uma revisão dos critérios relativos à presença de estafilococos coagulase positivos no queijo, no leite cru para transformação e no leite em pó e se estabelecessem critérios no que respeita à presença de enterotoxinas estafilocócicas no queijo e no leite em pó. (24)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Nomeadamente em queijo, leite em pó e soro de leite em pó, efectua-se a pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas, onde existe um plano de amostragem, em que o $n = 5$ (n é o número de unidades que constituem a amostra) e $c = 0$ (c é o número de unidades da amostra com valores superiores a m ou compreendidos entre m (limite mínimo) e M (limite máximo)). Para estes produtos, o regulamento estipula que não podem detectadas enterotoxinas em 25 g. O método de análise de referência a considerar é o Método europeu de despiste do LCR para o leite ((Utilizar-se-á a edição mais recente da norma), referência: Hennekinne et al., J. AOAC Internat. Vol. 86, n.º 2, 2003). Este critério aplica-se a produtos colocados no mercado, durante o seu período de vida útil. Para interpretação dos resultados dos testes de pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas em produtos lácteos, os seguintes critérios: (24)

- Satisfatória, se não forem detectadas enterotoxinas em nenhuma das unidades de amostra. (24)
- Não satisfatória, se for detectada a presença de enterotoxinas em qualquer uma das unidades da amostra. (24)

Em queijo fabricado com leite cru, efectua-se a pesquisa de estafilococos coagulase positivos. Aplica-se para este tipo de produto um plano de amostragem, em que o $n = 5$ (n é o número de unidades que constituem a amostra) e $c = 2$ (c é o número de unidades da amostra com valores superiores a m ou compreendidos entre m (limite mínimo) e M (limite máximo)). Para estes produtos, o regulamento estipula que existe um limite mínimo de 104 ufc/g e um limite máximo de 105 ufc/g. O método de análise de referência a considerar é a norma EN/ISO 6888-1/2. A melhoria da higiene na produção e da selecção de matérias-primas, são medidas aplicáveis caso se registem valores superiores aos limites estabelecidos. Se se detectarem valores > 105 ufc/g, o lote de queijo deve ser testado relativamente à presença de enterotoxinas estafilocócicas. (24)

Em queijo fabricado com leite que tenha sido submetido a tratamento térmico mais baixo que o da pasteurização (excluindo os queijos em relação aos quais o fabricante puder demonstrar, a contento das autoridades competentes, que o produto não apresenta qualquer risco relativamente à presença de enterotoxinas estafilocócicas) e queijo curado fabricado com leite ou soro de leite que tenha sido submetido a pasteurização ou

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

tratamento térmico mais elevado, também se efectua a pesquisa de estafilococos coagulase positivos. O regulamento estipula que existe um limite mínimo de 100 ufc/g e um limite máximo de 1000 ufc/g. O método de análise de referência a considerar é a norma EN/ISO 6888-1/2. Para estes tipos de produtos aplica-se um plano de amostragem, em que $n = 5$ e $c = 2$. (24)

O queijo de pasta mole não curado (queijo fresco) fabricado com leite ou soro de leite que tenha sido submetido a pasteurização ou tratamento térmico mais elevado (excluindo os queijos em relação aos quais o fabricante puder demonstrar, a contento das autoridades competentes, que o produto não apresenta qualquer risco relativamente à presença de enterotoxinas estafilocócicas), também neste é considerado importante a pesquisa de estafilococos coagulase positivos. É estabelecido, para este tipo de produto, um plano de amostragem, com $n = 5$ e $c = 2$. O regulamento define o m igual a 10 ufc/g e o M igual a 100 ufc/g. Considera-se o método de análise de referência a norma EN/ISO 6888-1 ou 2. Este critério deve ser tido em conta aquando da fase final do processo de fabrico. Em caso positivo, deve-se melhorar a higiene na produção. Se se detectarem valores > 105 ufc/g, o lote de queijo deve ser testado relativamente à presença de enterotoxinas estafilocócicas. (24)

Em leite em pó e soro de leite em pó (critério não é aplicável aos produtos destinados a posterior transformação na indústria alimentar). Define-se como necessária a pesquisa de estafilococos coagulase positivos. Estabelece-se o $n = 5$ e $c = 2$. O regulamento define o m igual a 10 ufc/g e o M igual a 100 ufc/g. Considera-se o método de análise de referência a norma, EN/ISO 6888-1 ou 2. Este critério é aplicável no fim do processo de produtivo. Se os resultados forem negativos deveram ser promovidas medidas de melhoria das condições de higiene na produção. Se se detectarem valores > 105 ufc/g, o lote deve ser testado relativamente à presença de enterotoxinas estafilocócicas. (24)

Em produtos descascados e sem concha à base de crustáceos e moluscos cozidos. Efectua-se a pesquisa de estafilococos coagulase positivos. Estabelece-se no plano de amostragem o $n = 5$ e $c = 0$. O regulamento define o m igual a 100 ufc/g e o M igual a

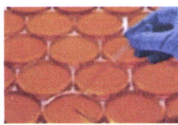
“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

1000 ufc/g. O método de análise de referência é a norma, EN/ISO 6888-1 ou 2. A amostra é recolhida no final do processo produtivo. (24)

Para interpretação dos resultados dos testes de pesquisa de estafilococos coagulase positivos em crustáceos e moluscos descascados e cozidos: (24)

- Satisfatória, se todos os valores observados forem $\leq m$;
- Aceitável, se houver um máximo de c/n valores entre m e M e os restantes valores observados forem $\leq m$;
- Não satisfatória, se um ou mais valores observados forem $> M$ ou mais do que c/n valores estiverem entre m e M.

O risco de *Staphylococcus aureus* em alimentos e animais



A Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) publicou um parecer sobre o impacto para a saúde pública da presença de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) em alimentos e animais. (25)

O Painel da EFSA sobre Riscos Biológicos (BIOHAZ) verificou que, embora os alimentos possam estar contaminados com MRSA, não existem actualmente quaisquer evidências de que a ingestão ou manipulação de alimentos contaminados possa conduzir a um acréscimo do risco dos humanos se tornarem portadores saudáveis ou de serem infectados com esta bactéria. (25)

O Painel concluiu também que é elevada a prevalência de MRSA em animais destinados à produção de alimentos e que as pessoas que estão em contacto com animais vivos, em particular agricultores, veterinários e seus familiares, têm maior risco do que a população em geral. (25)

No caso dos animais destinados à produção de alimentos, um tipo específico de MRSA, CC398, emergiu e, frequentemente, os animais de produção intensiva são portadores assintomáticos desta bactéria. (30)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Vários tipos de MRSA, incluindo CC398, podem ser encontrados em matadouros e em carne crua, mas o Painel afirmou, baseado nos dados actuais, que o risco de infecção dos trabalhadores de matadouros e manipuladores de carne parece ser baixo. (25)

Também afirmou que não existem evidências de que o consumo de carne contaminada se traduza numa infecção de humanos ou que esta estirpe tenha causado intoxicações alimentares. (25)

Nos países afectados, esta estirpe foi essencialmente detectada em porcos, vitelas e frangos. (30)

Quanto a opções de controlo, o Painel afirmou que o movimento de animais e o contacto entre animais constituem importantes fontes prováveis de transmissão de CC398. (30)

Também considerou que a monitorização sistemática de MRSA em todos os Estados-Membros deveria ser efectuada de modo a avaliar as tendências do desenvolvimento de MRSA em animais destinados à produção de alimentos, e recomendou que uma triagem sistemática dos pacientes admitidos em hospitais deveria ser expandida de modo a incluir categorias profissionais expostas a animais de produção intensiva. (30)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Alimentos mais afectados por *Staphylococcus aureus*

Dos muitos alimentos que têm sido implicados como causadores de intoxicações alimentares estafilocócicas, os produtos de pastelaria, bolos com cremes e com natas, fiambres e carnes de aves, são os que mais favorecem a intoxicação estafilocócica. (12)

Cerca de 75% dos surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, apresentam-se como consequência de uma refrigeração dos alimentos, inadequada e insuficiente. (12)

Entre os alimentos que causam este surtos, incluem-se outros tipos de alimentos, nomeadamente, carnes e produtos cárneos, peixes e seus derivados, leite e produtos lácteos e em empadas. (12)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Referências Bibliográficas:

- 1: AARESTRUP, F. M. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 12,1999.
- 2: BECKER, K. *et al.* Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, 2003.
- 3: ERCOLINI, D. *et al.* PCR-based detection of enterotoxin *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, 2004.
- 4: DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.13, 2000.
- 5: Doyle, Michael P., Beuchat, Larry R., Montville, J.Thomas; “**Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**”; 2nd ed.; 2001; ASM Press, Washington, d.c.;
- 6: Ferreira, Wanda F.C.; Sousa, João Carlos F.; “**Microbiologia**”; volume I; 1998; Lidel, Edições Técnicas;
- 7: FOOD AND DRUG ASSOCIATION. **Antimicrobial resistance**: a growing threat. http://www.fda.gov/oc/opacom/hottopics/anti_resist.html, consulta efectuada a 24/01/2008;
- 8: GILL, S. R. *et al.* Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 7, 2005.

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

9: HWANG, S. Y. *et al.* Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 117, 2007.

10: Lacasse, Denise; “**Introduction à la Microbiologie Alimentaire**”; 1999; Instituto Piaget;

11: LISA, R. W.; PLANO, M. D. *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins: How they cause disease. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 122, 2004.

12: Mossel, A. A. y Moreno, B. ; “**Microbiología de los alimentos**”; ACRIBIA, S.A.;

13: NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **TaxBrowser**, Washington, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>, consulta efectuada a 24/01/2008;

14: PROJAN, S.; NOVICK, R. The molecular basis of pathogenicity. In: CROSSLEY, K. B.; ARCHER, G. L. (Ed.). **The Staphylococci in Human Disease**. New York: Churchill Livingstone, 1997.

15: Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C., Tompkin, R.B.; **Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens**; ICMSF (1996); Blackie Academic & Professional; London.

16: SALASIA, S. I. O. *et al.* Comparative studies on pheno and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in Java in Indonesia and Hesse in Germany. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 5, 2004.

17: SCIENCE PHOTO LIBRARY. ***Staphylococcus aureus* bacteria, SEM**. Disponível em:
http://www.sciencephoto.com/images/showEnlarged.html/B234113Staphylococcus_aureus_bacteria_SEM-SPL.jpg?id=662340113, consulta efectuada a 18/04/2008;

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

18: SHARMA, N. K.; CATHERINE, E. D. R.; DODD, C. E. R. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, 2000.

19: Sneath, Peter H.A., Mair, Nicholas, Holt, John G.; “**Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology**”; volume 2; 1986; Williams & Wilkins;

20: STEVENS, D. L. Community-acquired *Staphylococcus aureus* infections: increasing virulence and emerging methicillin resistance in the new millennium. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 16, 2003.

21: TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **A reacção em cadeia da polimerase**. Microbiologia. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000;

22: <http://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2008luz-is.pdf>, consulta efectuada a 05/10/2009;

23: http://diario.iol.pt/noticia.html?id=759265&div_id=4071, consulta efectuada a 04/10/2009;

24: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:PT:PDF>, consulta efectuada a 27/09/2009;

REGULAMENTO (CE) N.º 2073/2005 DA COMISSÃO de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, consulta efectuada a 27/09/2009;

25: http://www.efsa.europa.eu:80/EFSA/efsa_locale1178620753812_1211902408708.htm, consulta efectuada a 29/07/2009;

26: <http://www.ehsportugal.com/temas.php?cat=281&scat=646#>, consulta efectuada a 22/07/2009;

27: <http://www.gppaa.min-agricultura.pt:80/RegAlimentar/legis/>, consulta efectuada a

28: <http://www.hannabrasil.com/Saiba mais sobre o pH dos alimentos53.htm>, consulta efectuada a 18/04/2008;

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

29: http://www.medicosdeportugal.iol.pt/action/2cnt_id/939/, consulta efectuada a 18/04/2008;

30: <http://qualfood.biostrument.com/index.php?option=noticia>, consulta efectuada a 22/07/2009;

316: http://www.sfdk.com.br/ciências_staphylococcus.asp, consulta efectuada a 31/01/2008;

32: <http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>, consulta efectuada a 18/04/2008;

33: http://www.todabiologia.com/microbiologia/reino_monera.htm, consulta efectuada a 24/09/2009;

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

Anexo:

Legislação:

Legislação Alimentar: Higiene dos Géneros Alimentícios

Reg. (CE) n° 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro

Critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, alterado pelo Reg. (CE) n° 1441/2007 da Comissão. (10)

Reg. (CE) n°852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril

Estabelece as regras relativas à higiene dos géneros alimentícios (10)

1. Alterado pelo Reg. (CE) n° 1019/2008 da Comissão
2. Alterado pelo Reg. (CE) n.° 219/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho

Reg. (CE) n° 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril

Estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal (10)

1. Alterado pelo Reg. (CE) n° 2074/2005 da Comissão
2. Alterado pelo Reg. (CE) n° 2076/2005 da Comissão
3. Alterado pelo Reg. (CE) n° 1662/2006 da Comissão
4. Alterado pelo Reg. (CE) n° 1791/2006 do Conselho
5. Alterado pelo Reg. (CE) n° 1243/2007 da Comissão
6. Alterado pelo Reg. (CE) n° 1020/2008 da Comissão
7. Alterado pelo Reg. (CE) n.° 219/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho

Reg. (CE) n° 2074/2005 da Comissão de 5 de Dezembro

Estabelece medidas de execução para determinados produtos ao abrigo do Reg. (CE) n° 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e para a organização de controlos oficiais ao abrigo do Reg. (CE) n° 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e o Reg. (CE) n° 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, que derroga o Reg. (CE)

“Comportamento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de crescimento”

nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e altera o Reg. (CE) nº 853/2004 e o Reg. (CE) nº 854/2004. (10)

1. Alterado pelo Reg. (CE) nº 1664/2006 da Comissão
2. Alterado pelo Reg. (CE) nº 1244/2007 da Comissão
3. Alterado pelo Reg. (CE) nº 1022/2008 da Comissão
4. Alterado pelo Reg. (CE) nº 1250/2008 da Comissão

Decreto-Lei nº113/2006, de 12 de Junho

Define o processo de aprovação dos Códigos Nacionais de Boas Práticas. (10)

1. Alterado pelo Decreto-Lei n.º 223/2008 de 18 de Novembro

Portaria nº699/2008 de 29 de Julho

Regulamenta as derrogações previstas no Reg. (CE) n.º 853/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril, e no Reg. (CE) n.º 2073/2005, da Comissão, de 15 de Novembro, para determinados géneros alimentícios. (10)

Despacho Normativo nº38/2008 de 13 de Agosto

Estabelece o procedimento para a concessão das adaptações aos requisitos de higiene aplicáveis à produção de géneros alimentícios. (10)