



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FÁBIO MARTINS CAMPOS

**EXPOSIÇÃO ÀS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS EM
PÃO DE QUEIJO**

Londrina
2019

FÁBIO MARTINS CAMPOS

**EXPOSIÇÃO ÀS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS EM
PÃO DE QUEIJO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof.^a Dra. Tereza Cristina Rocha
Moreira de Oliveira.

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C198e Campos, Fábio Martins.
Exposição às enterotoxinas estafilocócicas em pão de queijo / Fábio Martins Campos. - Londrina, 2019.
67 f. : il.

Orientador: Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Pão de queijo - Tese. 2. Estafilococos aureos - Tese. 3. Enterotoxinas - Tese. I. Oliveira, Tereza Cristina Rocha Moreira de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 663

FÁBIO MARTINS CAMPOS

**EXPOSIÇÃO ÀS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS EM
PÃO DE QUEIJO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof.^a Dra. Tereza Cristina Rocha
Moreira de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.^a Dra. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.^a Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza
da Cunha
Universidade Estadual Paulista - UNESP -
Campus Botucatu

Londrina, 29 de abril de 2019.

À minha querida avó, Alzira Martins Campos (*in
memorian*).

AGRADECIMENTOS

À Deus, responsável pela realização de mais este sonho.

À minha orientadora e idealizadora desta dissertação de mestrado a Prof.^a Dr.^a Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira, pela confiança, dedicação, ensinamentos, respeito, amizade, incentivo e contribuições em todas as etapas deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa por possibilitar o afastamento total das atividades para a realização desta pós-graduação *Stricto Sensu*.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de cursar o Mestrado em Ciência de Alimentos.

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus Botucatu, pela oportunidade de realizar parte deste trabalho no Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Microbiologia e Imunologia, coordenado pela Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha.

À Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, ao seu grupo de pesquisa (Lucas Silva, Nathalia Teixeira, Thaís Barbosa e Elka Ferreira) e a técnica de laboratório Aline Missio que me acolheram com todo carinho e respeito, e se dedicaram para que este trabalho se concretizasse.

À Prof.^a Dr.^a Marta de Toledo Benassi pelo carinho, conselhos e incentivos durante todo o mestrado.

À minha banca de qualificação, Prof.^a Dr.^a Elisa Yoko Hirooka e Prof.^a Dr.^a Sandra Garcia pelos ensinamentos e contribuições a este trabalho.

Aos professores (Fábio Yamashita, Wilma Spinosa, Thaís de Souza, Sandra Helena e Adelaide Beléia), aos laboratoristas (Marli Pereira, Patrícia Sambatti, Rubens Borges e Alessandra da Silva) e a secretária (Sandra Rezende) do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UEL pelo conhecimento transmitido, harmoniosa convivência, dedicação e parceria.

As minhas estagiárias Mylena Ronchi e Luma Sarai por todo auxílio, cooperação e parceria.

Aos amigos da Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba especialmente Gustavo Ribeiro, Juliana Barbosa, Katia Rocha, Vitângela Vieira, Vívian Raquel, Edmilson Amaral, Liliane Visôto, Marlon Pereira, Milene Terezinha e Everaldo Lopes pela paciência, amizade, apoio, sugestões e por terem me substituído no período no qual eu estava em treinamento.

Aos amigos Wilson Rodrigues, Regiane Victória de Barros Fernandes Botrel e Diego Alvarenga Botrel pelo apoio e incentivo de sempre.

À todos os mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos do programa de pós-graduação em Ciência de Alimentos - UEL, especialmente Francine Fernandes, Fernando de Godoi, Ítalo Marcos e Jéssika Menck pela amizade, cooperação e pelos bons momentos vividos dentro e fora do laboratório.

Aos meus pais José Salvador Campos e Lúcia Martins Campos e a minha irmã Fabiana Aparecida Martins Campos por acreditar neste sonho e pelo apoio incondicional.

E à todos que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, o meu muito obrigado.

O Valioso Tempo dos Maduros

Contei meus anos e descobri que terei menos tempo para viver daqui para a frente do que já vivi até agora.

Tenho muito mais passado do que futuro.

Sinto-me como aquele menino que recebeu uma bacia de jabuticabas.

As primeiras, ele chupou displicente, mas percebendo que faltam poucas, rói o caroço.

Já não tenho tempo para lidar com mediocridades.

Não quero estar em reuniões onde desfilam egos inflamados.

Inquieto-me com invejosos tentando destruir quem eles admiram, cobiçando seus lugares, talentos e sorte.

Já não tenho tempo para conversas intermináveis, para discutir assuntos inúteis sobre vidas alheias que nem fazem parte da minha.

Já não tenho tempo para administrar melindres de pessoas, que apesar da idade cronológica, são imaturos.

Detesto fazer acareação de desafectos que brigaram pelo majestoso cargo de secretário geral do coral.

‘As pessoas não debatem conteúdos, apenas os rótulos’.

Meu tempo tornou-se escasso para debater rótulos, quero a essência, minha alma tem pressa...

Sem muitas jabuticabas na bacia, quero viver ao lado de gente humana, muito humana; que sabe rir de seus tropeços, não se encanta com triunfos, não se considera eleita antes da hora, não foge de sua mortalidade, caminhar perto de coisas e pessoas de verdade.

O essencial faz a vida valer a pena.

E para mim, basta o essencial!

(Mário de Andrade)

CAMPOS, Fábio Martins. **Exposição às enterotoxinas estafilocócicas em pão de queijo**. 2019. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O pão de queijo é uma iguaria mineira produzida em todo o país e, devido a sua aceitação, houve um aumento significativo no número de produtores nos últimos anos, ampliando a sua oferta em redes de varejo. Por ser um produto perecível e apresentar grande manuseio durante as etapas de produção está sujeito à contaminação, sobrevivência e multiplicação de micro-organismos, capazes de causar toxinfecções alimentares. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em pão de queijo congelado e avaliar a possibilidade desse alimento causar intoxicação estafilocócica. Cem amostras de pão de queijo congelado produzidas por indústrias de Londrina, PR e região foram adquiridas no comércio local, de março a junho de 2018. A confirmação da presença de *S. aureus* foi realizada por identificação bioquímica e molecular. A detecção de genes codificadores das enterotoxinas estafilocócicas clássicas (A, B, C e D) foi realizada nos isolados de *S. aureus* pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a avaliação da possibilidade da produção de enterotoxina estafilocócica A (EEA) em pão de queijo, a massa foi contaminada com *S. aureus* American Type Culture Collection (ATCC) (13565) e incubada a 10 oC e 20 oC por 4, 6, 8 e 24 h. A detecção de EEA na massa de pão de queijo contaminada antes e após o assamento a 180 oC por 35 minutos foi realizada empregando a técnica de “reversed passive latex agglutination” (RPLA). Todas as amostras analisadas apresentaram contagem de coliformes a 45 °C e de *Escherichia coli* abaixo dos limites tolerados pela legislação brasileira. Das 100 amostras analisadas, 40 amostras (40%) estavam contaminadas com *S. aureus*, sendo que 27 (27%) estavam contaminadas com contagens acima de $5,0 \times 10^3$ UFC/g, que é o limite tolerado pela legislação. Na avaliação molecular de 62 cepas de *S. aureus* isoladas das amostras de pão de queijo nenhuma apresentou os genes sea, seb, sec e sed. O assamento a 180 oC por 35 minutos foi suficiente para inativar a EEA das amostras contaminadas e incubadas por 8h a 10 oC e 20 oC, porém não foi suficiente para inativar EEA das amostras incubadas por 24h a 10 oC e 20 oC. Os resultados obtidos nesse trabalho comprovam, que se forem dadas condições favoráveis, EEA pode ser produzida na massa de pão de queijo. Os resultados também sugerem que, dependendo da quantidade de enterotoxina presente na massa, essa pode manter a sua atividade imunológica após o assamento do pão de queijo. Fica evidente a necessidade do controle das matérias-primas utilizadas e das medidas que previnam a multiplicação de *S. aureus* durante a fabricação e conservação da massa do pão de queijo. Os resultados poderão fornecer informações que auxiliem a Vigilância Sanitária de Alimentos e as indústrias de pães de queijo na avaliação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e da Análise de perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) deste produto.

Palavras-chave: Pão de queijo. Enterotoxina estafilocócica. *Staphylococcus aureus*.

CAMPOS, Fábio Martins. **Contamination and molecular expression in the epidemiology of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in cheese bread.** 2019. 69 p. Dissertation (Master's Degree in Food Science) - State University of Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Cheese bread is a country delicacy produced throughout the country and, due to its acceptance, there has been a significant increase in the number of producers in recent years, expanding its supply in retail chains. Because it is a perishable product and presents great handling during the production stages, it is subject to the contamination, survival and multiplication of microorganisms, capable of causing alimentary toxoinfections. The present work had the objective of evaluating the occurrence of thermotolerant coliforms, *Escherichia coli* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in frozen cheese bread and to evaluate the possibility of this food causing staphylococcal intoxication. One hundred samples of frozen cheese bread produced by industries from Londrina, PR and region were purchased locally from March to June 2018. Confirmation of the presence of *S. aureus* was performed by biochemical and molecular identification. Detection of genes coding for classical staphylococcal enterotoxins (A, B, C and D) was performed on *S. aureus* isolates using the polymerase chain reaction (PCR) technique. For the evaluation of the possibility of staphylococcal enterotoxin A (EEA) production in cheese bread, the mass was contaminated with *S. aureus* American Type Culture Collection (ATCC) (13565) and incubated at 10 °C and 20 °C for 4, 6, 8 and 24 h. The detection of EEA in the dough of contaminated cheese before and after roasting at 180 °C for 35 minutes it was performed using the reversed passive latex agglutination technique (RPLA). All samples analyzed showed coliform counts at 45 °C and *Escherichia coli* below the limits tolerated by Brazilian legislation. Of the 100 samples analyzed, 40 samples (40%) were contaminated with *S. aureus*, 27 (27%) of which were contaminated with counts above 5.0×10^3 CFU / g, which is the limit tolerated by legislation. In the molecular evaluation of 62 strains of *S. aureus* isolated from the samples of cheese bread none presented the genes *sea*, *seb*, *sec* and *sed*. The roasting at 180 °C for 35 minutes was sufficient to inactivate the EEA from contaminated samples and incubated for 8h at 10 °C and 20 °C, but was not sufficient to inactivate EEA from samples incubated for 24h at 10 °C and 20 °C. The results obtained in this work prove that if favorable conditions are given, EEA can be produced in cheese dough. The results also suggest that, depending on the amount of enterotoxin present in the pasta, it can maintain its immunological activity after cheese bread baking. It is evident the necessity of the control of the raw materials used and the measures that prevent the multiplication of *S. aureus* during the manufacture and conservation of the mass of cheese bread. The results may provide information that will assist the Food Sanitary Surveillance and the cheese bread industries in the evaluation of Good Manufacturing Practices (GMP) and Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) of this product.

Keywords: Cheese bread. *Staphylococcus aureus*. Staphylococcal Enterotoxin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Kits imunológicos disponíveis comercialmente para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos	23
Tabela 2 - Número de amostras de pão de queijo congelado analisadas por marca e local de coleta	28
Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR para detecção dos genes sea, seb, sec e sed e tamanho dos produtos amplificados	33

ARTIGO

Tabela 1 - Número de amostras de pão de queijo congelado analisadas por marca e local de coleta	43
Tabela 2 - Resultados da contagem de <i>S. aureus</i> nas amostras de pão de queijo congelado por cada marca analisada	48
Tabela 3 - Médias das Contagens de <i>S. aureus</i> produtor de EEA em massa de pão de queijo antes do assamento ¹	51
Tabela 4 - Resultado da produção de EEA nas massas de pão de queijo contaminadas com <i>S. aureus</i> e incubadas a 10 °C ou 20 oC por 4, 6, 8 e 24 horas	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fluxograma da contaminação das amostras de pão de queijo com *S. aureus* ATCC 13565, produtor de EEA. O experimento realizado em duplicata e repetido duas vezes 35
- Figura 2** - Ilustração da microplaca em V na qual foi realizado o ensaio RPLA com as amostras de pão de queijo contaminadas com 103 UFC/g de *S. aureus* e incubadas a 10 oC e 20 oC por 4, 6, 8 e 24 horas, antes e após o assamento 37
- Figura 3** - Padrão de Aglutinação nos poços..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABP	Ágar Baird Parker
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusão de Cérebro e Coração
BPF	Boas Práticas de Fabricação
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNAc	Ácido Desoxirribonucléico complementar
EC	Escherichia coli
ECN	Estafilococos coagulase negativa
EEA	Enterotoxina estafilocócica A
EEB	Enterotoxina estafilocócica B
EEC	Enterotoxina estafilocócica C
EED	Enterotoxina estafilocócica D
EEE	Enterotoxina estafilocócica E
EEG	Enterotoxina estafilocócica G
EEH	Enterotoxina estafilocócica H
EEI	Enterotoxina estafilocócica I
EEIJ	Enterotoxina estafilocócica like J
EEIK	Enterotoxina estafilocócica like K
EEIL	Enterotoxina estafilocócica like L
EEIM	Enterotoxina estafilocócica like M
EEIN	Enterotoxina estafilocócica like N
EEIO	Enterotoxina estafilocócica like O
EEIP	Enterotoxina estafilocócica like P
EEIQ	Enterotoxina estafilocócica like Q
EEIU	Enterotoxina estafilocócica like U
EEIV	Enterotoxina estafilocócica like V
EEIW	Enterotoxina estafilocócica like W
EER	Enterotoxina estafilocócica R
EES	Enterotoxina estafilocócica S

EET	Enterotoxina estafilocócica T
ELFA	Enzyme-linked fluorescent assay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMB	Eosina Azul de Metileno
NMP	Número Mais Provável
OSP	Optimum Sensitivity Plate
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RT-PCR	Reação da Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa
RIA	Radioimunoensaio
RPLA	Reversed Passive Látex Agglutination
sea	Staphylococcal enterotoxin a
seb	Staphylococcal enterotoxin b
sec	Staphylococcal enterotoxin c
sed	Staphylococcal enterotoxin d
see	Staphylococcal enterotoxin e
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	STAPHYLOCOCCUS AUREUS E INTOXICAÇÃO ESTAFILOCÓCICA	18
3.2	DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS	21
3.3	DETECÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS	24
3.4	GENERALIDADES SOBRE PÃO DE QUEIJO	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	COLETA DAS AMOSTRAS	28
4.2	PREPARO DAS AMOSTRAS	28
4.3	CONTAGEM DE COLIFORMES E E. COLI	29
4.4	CONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE S. AUREUS	29
4.5	CONFIRMAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE S. AUREUS IDENTIFICADOS BIOQUIMICAMENTE	30
4.6	DETECÇÃO DOS GENES SEA, SEB, SEC E SED CODIFICADORES DAS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS A, B, C E D	31
4.6.1	Extração de DNA	31
4.6.2	Condição da PCR	32
4.6.3	Análise de Produtos De Amplificação	33
4.7	ESTUDO DA CAPACIDADE DE S. AUREUS PRODUTOR DE EEA EXPRESSAR A ENTEROTOXINA NA MASSA DE PÃO DE QUEIJO	33
4.7.1	Preparo do Inóculo	33
4.7.2	Preparo da Massa de Pão de Queijo e Contaminação com S. Aureus Produtor de EEA	34

4.8	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE S. AUREUS ENTEROTOXIGÊNICO PRODUZIR ENTEROTOXINA A NA MASSA PÃO DE QUEIJO ANTES E APÓS O ASSAMENTO	36
4.9	AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA A APÓS O PROCESSAMENTO TÉRMICO DO PÃO DE QUEIJO	39
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
5.1	ARTIGO CIENTÍFICO	40
6	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

O pão de queijo é um produto tipicamente brasileiro, originado do estado de Minas Gerais, e hoje consumido em todo o país e no exterior. Os ingredientes obrigatórios na formulação são: polvilho, leite ou água, queijo, óleo vegetal ou manteiga, ovos e sal (GRANZA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2017; ZAPATA *et al.*, 2019). Os fabricantes estão inovando para agregar valor ao produto, incorporando outros ingredientes à receita original, como bacon, salsicha, calabresa, parmesão, batata, iogurte, coalhada, requeijão, entre outros.

Devido a elevada aceitação, a oferta de pão de queijo congelado em redes de varejo aumentou nos últimos anos. Outrossim, trata-se de um produto perecível, sujeito a constante manuseio e possibilita a contaminação, sobrevivência e multiplicação de micro-organismos capazes de causar toxinfecção alimentar. A contaminação pode ser proveniente da matéria-prima ou da falta de cuidados durante a fabricação.

Entre as bactérias patogênicas capazes de contaminar a massa do pão de queijo destaca-se o *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico. O vestíbulo nasal do ser humano é o principal habitat natural de *S. aureus*, propagando outros sítios anatômicos, como as mãos. Essa, portanto, pode ser uma via de transmissão dessa bactéria para o pão de queijo, principalmente, no caso de pequenas indústrias. *S. aureus* pode causar mastite clínica e sub-clínica em bovinos e contaminar o leite e derivados (FORSYTHE, 2013). O queijo ingrediente básico utilizado na fabricação de pão de queijo, foi associado a casos e surtos de intoxicação estafilocócica. Surtos dessa doença já foram relatados em Minas Gerais atribuídos ao consumo de queijo tipo minas artesanal contaminado (DORES *et al.*, 2013).

A intoxicação estafilocócica decorre da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas no alimento, sendo a presença em massa do pão de queijo decorre de ingredientes contaminados, ou produção de enterotoxina durante a fabricação do produto (FERRARI; WINKLER; OLIVEIRA, 2007). Existem vinte e três enterotoxinas estafilocócicas, sendo as enterotoxinas clássicas, comumente relacionadas às intoxicações alimentares, são: A, B, C₁, C₂, C₃, D e E. A maioria dos genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas ocorrem em elementos móveis, como plasmídeos, bacteriófagos ou ilhas de patogenicidade. As transferências de

genes entre os isolados são comuns, assim como é frequente um único isolado produzir mais de um tipo de enterotoxina estafilocócica (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010; SILVA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2015).

As enterotoxinas estafilocócicas apresentam estabilidade à uma variação físico-química, sendo a termoestabilidade a principal característica, resistindo a temperaturas e tempos de cocção utilizados em rotinas domésticas e industriais (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010; SILVA *et al.*, 2015; FDA, 2012; FORSYTHE, 2013; NECIDOVÁ *et al.*, 2016; NECIDOVÁ *et al.*, 2019).

A legislação brasileira não tem um regulamento técnico de identidade e qualidade de pão de queijo, tampouco parâmetros microbiológicos específicos para avaliar a presença de *S. aureus* enterotoxigênicos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece, a tolerância de $5,0 \times 10^3$ UFC/g de estafilococos coagulase positiva de pão de queijo para amostra indicativa (RDC nº12, ANVISA).

O trabalho avaliou a ocorrência de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em pão de queijo congelado comercializado na cidade de Londrina-PR e avaliar o perigo de pão de queijo causar intoxicação estafilocócica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em pão de queijo congelado e avaliar a possibilidade desse alimento causar intoxicação estafilocócica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar a contagem de coliformes termotolerantes, *E. coli* e *S. aureus* em amostras de pão de queijo congelado de diferentes marcas comercializadas em supermercados;
- b) Pesquisar por PCR os genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* responsáveis pela expressão das enterotoxinas estafilocócicas A, B, C e D, respectivamente, em cepas de *S. aureus* isoladas das amostras de pão de queijo;
- c) Avaliar a produção de enterotoxina estafilocócica em massa de pão de queijo contaminada com *S. aureus* produtor de enterotoxina estafilocócica A (EEA);
- d) Avaliar se a inativação de EEA pós-processamento térmico do pão de queijo artificialmente contaminado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E INTOXICAÇÃO ESTAFILOCÓCICA

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* e compreende 53 espécies e 28 sub-espécies divididas em dois grupos, de acordo com a produção de coagulase (Euzéby, 2018). O grupo dos estafilococos coagulase positiva é constituído das espécies *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. lutrae*, *S. agnetis* e *S. pseudointermedius*. As outras espécies são denominadas de estafilococos coagulase negativa (DEVRIESE *et al.*, 2005; FRENEY *et al.*, 1999; SASAKI *et al.*, 2010; TAPONEN *et al.*, 2012).

S. aureus é a principal espécie associada à intoxicação, embora a produção de enterotoxinas ser relatada também em outras espécies coagulase positiva e negativa (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010). A ingestão de alimento contaminado com toxina pré-formada é responsável pela intoxicação, sendo o vômito e diarreia os sintomas clínicos frequentes após 2 a 6 horas de ingestão, é autolimitada na maioria dos casos, embora haja relato de óbito. Outros sintomas são salivação, desidratação, dores musculares, náusea, câimbras abdominais, cefaleia, queda de temperatura e pressão sanguínea (DO CARMO *et al.*, 2004; FDA, 2018; FORSYTHE, 2013; FRANCO; LANDGRAF, 2008; SHIJIA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017). Além do efeito emético, a enterotoxina estafilocócica atua sobre o sistema imune, desencadeando intensa proliferação de linfócitos T e estimulando ou diminuindo a produção de anticorpo (ELABRAS FILHO *et al.*, 2016; FRANCO; LANDGRAF, 2008; GORMAZ *et al.*, 2010; SHIJIA *et al.*, 2016).

Seres humanos e animais de sangue quente são reservatórios naturais de *S. aureus*, com o principal habitat em mucosa nasal humana. A presença de *S. aureus* em alimentos indica, geralmente, contaminação por manipuladores, estando os surtos normalmente associados a produtos com manipulação durante a preparação, e seguidas vezes mantidos em temperatura ambiente (DO CARMO *et al.*, 2004; FORSYTHE, 2013; FRANCO; LANDGRAF, 2008). Outros fatores contribuem para o aparecimento de surtos de intoxicação estafilocócica são as condições inadequadas de limpeza e sanitização de materiais e equipamentos, o uso de matéria-prima contaminada, o cozimento ou descongelamento inadequado e

o aproveitamento de sobras de alimentos (FORSYTHE, 2013; PORTO, 2017).

Estima-se que quantidades entre 0,015 e 0,375 μg de enterotoxina por quilo de peso corpóreo sejam suficientes para causar os sintomas da intoxicação (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A resistência das enterotoxinas à proteólise por tripsina, quimiotripsina, pepsina e papaína permite a passagem pelo trato gastrointestinal. A quantidade de toxina capaz de causar intoxicação depende do peso e da sensibilidade individual (PORTO, 2017; TEWARE; JUNEJA, 2007).

Os alimentos contendo a enterotoxina pré-formada apresentam, na maioria das vezes aparência, odor e sabor normais (WALLS *et al.*, 2017). Os alimentos frequentemente envolvidos em intoxicação estafilocócica são carnes e derivados, produtos de ovos, peixe ou massa prontos para consumo, leite e derivados e produtos de confeitaria (FORSYTHE, 2013). As enterotoxinas são detectáveis nos alimentos que apresentam contagens de *S. aureus* acima de 10^5 UFC/g de alimento. A presença de um grande número de estafilococos em um alimento não é suficiente para comprovar que o alimento foi o responsável pela intoxicação. A ausência deste patógeno, porém, não o exclui como causador da doença. A estabilidade térmica das enterotoxinas estafilocócicas exige que seja determinada a presença da enterotoxina no alimento ou dos genes responsáveis pela expressão das enterotoxinas nas cepas isoladas dos alimentos (LANCETTE; TATINI, 1992; SANTANA *et al.*, 2010).

Os processos térmicos utilizados na fabricação de alimentos como pasteurização e esterilização comercial eliminam as células de *S. aureus*. Surtos de intoxicação estafilocócica, no entanto, foram causados por leite pasteurizado (BORGES *et al.*, 2008; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLERR, 2014; NECIDOVA *et al.*, 2016) e leite esterilizado (BORGES *et al.*, 2008; EVENSON *et al.*, 1988; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLERR, 2014). Nesses casos, provavelmente, a manutenção inadequada do leite antes da pasteurização ou esterilização comercial permitiu a multiplicação de *S. aureus* e produção de enterotoxina, que não foi inativada após os processamentos térmicos.

Tibana *et al.* (1987) analisaram a estabilidade térmica da EEA, EEB e EEC em um sistema tamponado contendo 100 ng/mL de enterotoxina. Os resultados indicaram as temperaturas e tempos de cocção utilizados em rotinas domésticas não foram suficientes para a inativação completa das enterotoxinas. A EEC apresentou maior resistência térmica seguida pela EEA e EEB. Portanto, a

utilização de matéria-prima não contaminada e a prevenção da multiplicação de *S. aureus* no alimento são essenciais, mesmo em produtos processados termicamente, devido a termoestabilidade das enterotoxinas.

Necidová *et al.* (2016) mostraram que a inativação de EEA, EEB e EEC, após pasteurização em diferentes temperaturas (72, 85 e 92 °C) não foi completa. Observou-se, entretanto, uma redução das concentrações das enterotoxinas. Essa redução foi influenciada pelos níveis iniciais de enterotoxinas, pela temperatura e pelo tipo de enterotoxina. O mesmo foi observado por Necidová *et al.* (2019), após autoclavação de leite contaminado por EEA, EEB e EEC a 100 °C, 110 °C e 121 °C por 3 minutos.

Em 1884, Vaughan e Sterberg, relataram pela primeira vez *S. aureus* como agente etiológico de um surto de origem alimentar, envolvendo queijo contaminado (HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2012). Desde então surtos têm sido reportados em vários países (CDC, 2016; DENAYER *et al.*, 2017; DO CARMO *et al.*, 2004; ; GUIDI *et al.*, 2018; TAM; TORRES, 2019).

No Brasil, entre 2000 e 2017, foram reportados 12.660 surtos alimentares, com 2.372.132 indivíduos expostos, 239.164 doentes e 186 óbitos. *S. aureus* foi identificado como agente etiológico em 18,2% dos surtos neste período (BRASIL, 2019). As intoxicações estafilocócicas têm sido muitas vezes inadequadamente investigadas porque na maioria dos casos a sintomatologia é moderada e a doença é de curta duração, que pode ser de poucas horas a um dia.

Vários trabalhos também têm relatado a detecção de genes responsáveis pela expressão das enterotoxinas estafilocócicas em cepas de *S. aureus* isoladas de diferentes alimentos em vários países (CHAO *et al.*, 2015; CHENG *et al.*, 2016; MANSOUR *et al.*, 2017; NUNES *et al.*, 2016).

Em 2017, o *European Food Safety Authority/European Center for Disease Prevention and Control* reportou a contaminação de diferentes alimentos com enterotoxina estafilocócica, produzidos por diferentes países europeus. A percentagem de alimentos contaminados foi diferente, dependendo do país de origem dos alimentos.

3.2 DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

As enterotoxinas estafilocócicas constituem um grupo heterogêneo de polipeptídeos de cadeia simples, com massa molecular variando de 27,5 a 30,0 KDa. São solúveis em água e contém resíduos de aminoácidos lisina, ácido aspártico e glutâmico em maiores proporções, além de dois resíduos de cisteína sob a forma de pontes dissulfeto (BENNETT, 2005; BERGDOLL *et al.*, 1996; FRANCO; LANDGRAF, 2008; JAY, 2005). A purificação e a caracterização das enterotoxinas estafilocócicas tiveram início em 1959 (BERGDOLL; SURGALLA; DACK, 1959) e, atualmente, 23 enterotoxinas sorologicamente distintas são classificadas como eméticas (EEA, EEB, EEC, EED, EEE, EEG, EEH, EEI, EELK, EELL, EELM, EELN, EELO, EELP, EELQ, EER, EES, EET) e não-eméticas (EELJ, EELU, EELV, EELX E EELW) (FISCHER; OTOODENAYER *et al.*, 2017; OMOE *et al.*, 2017; SEO, 2016; SILVA *et al.*, 2017).

A estrutura das enterotoxinas compacta e não hidratada confere estabilidade frente a uma grande variação físico-química salientando-se a termo resistência como característica principal. Entre os fatores que afetam a multiplicação de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas destacam-se o nível de contaminação, a microbiota competitiva, o tipo de enterotoxina produzida, a temperatura de conservação, a atividade de água, acidez, atmosfera de armazenamento, concentração de NaCl, presença de outros sais, antibióticos, antioxidantes e embalagem (CINTRA, 2015; HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2011, PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010).

A contagem e identificação bioquímica de estafilococos coagulase positiva não são suficientes para a confirmação do envolvimento de um alimento como a causa da intoxicação estafilocócica (FETSCH; JOHLE, 2018). A detecção de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas no alimento é decisiva para confirmar a intoxicação e determinar a enterotoxigenicidade de linhagens (FDA, 2012).

Os ensaios biológicos utilizando animais foram os primeiros testes a serem desenvolvidos. Esses ensaios, porém, são utilizados no momento apenas para detectar enterotoxinas ainda não identificadas devido à sua incapacidade de diferenciar as enterotoxinas e à dificuldade na manutenção dos animais (SHIJIA *et al.*, 2016).

A detecção das enterotoxinas estafilocócicas é rotineiramente

realizada através de métodos imunológicos como, por exemplo, ensaio imunoenzimático, imunofluorescente, imunodifusão, radioensaio e aglutinação passiva em látex. A quantidade de enterotoxina estafilocócica nos alimentos envolvidos em surtos varia de 0,75 a 10 ng/mL, exigindo para a sua detecção métodos de elevada sensibilidade (EVENSON *et al.*, 1988). Alguns ensaios imunológicos, que apresentam sensibilidade igual ou inferior a 1ng/mL estão disponíveis comercialmente. Os mais utilizados estão apresentados na tabela 1.

Os ensaios imunológicos apresentam vantagens, mas, é preciso cautela e validação quando da sua utilização. *Kits* disponíveis comercialmente apresentam ainda um custo inacessível para uso na rotina dos laboratórios brasileiros. O SET-RPLA (OXOID), disponível no Brasil, custa R\$ 6.684,00 (LABORSYS, Curitiba, Paraná). O VIDAS, também comercializado no Brasil, é um ensaio automatizado e utilizado na forma de comodato, o que exige uma grande demanda para o seu uso. O TECRA, o TRANSIA e o RIDASCREEN não são comercializados no Brasil (informação pessoal dos fabricantes).

Um estudo envolvendo 13 laboratórios canadenses avaliou os *kits* TECRA, TRANSIA e VIDAS e mostrou que todos detectaram 1,0 ng de EEA ou EEB por grama de presunto (BENNETT *et al.*, 1994). Amostras de alimentos contaminadas com *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter agglomerans* mostraram reações inespecíficas com o *kit* TECRA (PARK; AKHTAR; RAYMAN, 1992).

A técnica de aglutinação passiva em látex de fase reversa (*Reversed Passive Latex Agglutination* - RPLA) detecta e diferencia as enterotoxinas estafilocócicas A, B, C e D. O anticorpo policlonal produzido em coelhos é específico para cada uma das quatro enterotoxinas. Nesse ensaio de aglutinação reversa, o anticorpo está ligado às partículas de látex e reage com as enterotoxinas solúveis na amostra. As partículas de látex não participam diretamente da reação e, por isso a aglutinação é chamada de passiva. A ligação das partículas de látex pela reação específica antígeno / anticorpo resulta em uma reação visível de aglutinação do látex. O kit SET-RPLA foi desenvolvido sob a orientação do *Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health*, baseado nos trabalhos de Shingaki *et al.* (1981) e Oda *et al.* (1978) (OXOID, 2019). O kit SET-RPLA é comercializado pela Denka Seiken (Japão) e OXOID (Inglaterra). O kit SET-RPLA pode ser usado para detectar enterotoxinas estafilocócicas em uma ampla variedade de alimentos e

também pode ser usado para detectar a produção de enterotoxinas em isolados de *S. aureus*.

Tabela 1. Kits imunológicos disponíveis comercialmente para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos

Kit	Método	Fabricante
SET-RPLA® ¹	Aglutinação em látex de fase reversa. Detecção e diferenciação de EEA, EEB, EEC e EED. Anticorpos policlonais. Sensibilidade de 1 ng/g.	Denka Seiken (Tóquio, Japão), OXOID (Inglaterra)
TRANSIA PLATE® (tem versão automatizada) ²	ELISA. Detecção de EEA, EEB, EEC ₁ , EEC ₂ , EEC ₃ , EED e EEE. Anticorpos policlonais e monoclonais. Sensibilidade de 0,25 ng/g.	Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha)
TRANSIA TUBE® ²	ELISA. Detecção de EEA, EEB, EEC ₁ , EEC ₂ , EEC ₃ , EED e EEE. Anticorpos policlonais e monoclonais. Sensibilidade de 0,50 ng/g.	Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha)
TRANSIA PLATE Plus® ²	ELISA. Detecção de EEA, EEB, EEC ₁ , EEC ₂ , EEC ₃ , EED e EEE. Anticorpos policlonais e monoclonais. Sensibilidade de 0,25 ng/g. Leite/derivados e sobrenadante de cultura.	Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha)
TRANSIA ID® (tem versão automatizada) ²	ELISA. Detecção e identificação de EEA, EEB, EEC, EED e EEE. Anticorpos policlonais e monoclonais. Sensibilidade de 20-60 pg/g.	Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha)
RIDASCREEN SET® ³	ELISA. Detecção e diferenciação de EEA, EEB, EEC ₁ , EEC ₂ , EEC ₃ , EED e EEE. Sensibilidade de 0,25 a 0,375 ng/g.	R-Biopharm AG (Darmstadt, Alemanha)
RIDASCREEN SET TOTAL® ³	ELISA. Detecção de EEA, EEB, EEC ₁ , EEC ₂ , EEC ₃ , EED e EEE. Sensibilidade de 0,25 a 0,375 ng/g.	R-Biopharm AG (Darmstadt, Alemanha)
VIDAS SET2® ⁴ (é automatizado)	ELFA. Detecção de EEA, EEB, EEC, EED e EEE. Sensibilidade de 0,25 a 0,5 ng/g.	BioMérieux AS (Marcy-l'Etoile, França)
TECRA SET VIA® ⁵	ELISA visual. Detecção de EEA, EEB, EEC ₁ , EEC ₂ , EEC ₃ , EED e EEE. Sensibilidade de 1 ng/g.	Bioenterprises (Roseville, Austrália)
TECRA SET ID VIA® ⁵	ELISA visual. Detecção e identificação de EEA, EEB, EEC, EED e EEE. Sensibilidade de 1 ng/g.	Bioenterprises (Roseville, Austrália)

¹ http://www.oxid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=TD0900&org=153&c=uk&lang=EN

² http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/transia_staphylococcal_enterotoxins.pdf

³ <https://food.r-biopharm.com/products/ridascreen-set-abcde/>

⁴ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18376599>, <http://www.biomerieux.com.br/recursos/vidasr-set->

⁵ <https://multimedia.3m.com/mws/media/768188O/3m-tecra-pathogen-and-toxin-visual-immunoassay-via-tests.pdf>

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ELFA: Enzyme-Linked Fluorescent Assay

3.3 DETECÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

Os métodos tradicionais de detecção de microrganismos em alimentos, embora confiáveis e eficientes, requerem vários dias antes dos resultados serem obtidos. Além disso, as propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser sempre expressas e quando são, podem ser difíceis de serem interpretadas e classificadas. Além disso, as células podem não ser detectadas por estarem em um estado viável, porém não cultivável (MALORNY *et al.*, 2003).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico microbiano tem sido usada em vários laboratórios como uma alternativa aos métodos tradicionais de detecção. As vantagens são o limite de detecção, seletividade, especificidade, sensibilidade e o potencial para automação.

A PCR permite a amplificação de uma região específica do DNA (OLIVEIRA *et al.*, 2007; SAIKI *et al.*, 1985). Isto é possível em virtude da utilização de dois oligonucleotídeos iniciadores. Esta amplificação se faz no equipamento denominado termociclador, onde vários ciclos se sucedem (normalmente de 25 a 45 ciclos). Cada ciclo corresponde a: temperatura de desnaturação do DNA molde, temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores e temperatura de extensão através da utilização de uma polimerase termoresistente. O DNA amplificado pode ser visualizado em gel de agarose sob luz ultravioleta. Existem variantes para a PCR, tais como, a Multiplex PCR, onde vários genes são amplificados ao mesmo tempo o que permite a detecção simultânea, em uma única reação, de vários patógenos, economizando tempo e dinheiro na detecção (RAMESH *et al.*, 2002), entretanto, a sensibilidade diminui.

O teste de coagulase é utilizado para a diferenciação entre os estafilococos coagulase positiva e negativa. Métodos moleculares como PCR podem auxiliar na identificação de isolados pouco produtores de coagulase ou que não expressam o gene (SANTOS, 2003). A PCR pode ser utilizada na rotina laboratorial com sensibilidade e especificidade, pois identifica e ou diferencia os estafilococos coagulase negativa e positiva.

A PCR pode também ser utilizada para a identificação dos genes responsáveis pela produção de enterotoxina, independente da quantidade de enterotoxina produzida e das condições de cultivo das linhagens (SCHMITZ *et al.*,

1998). A presença dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej* foi avaliada em 258 cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos. Paralelamente, à expressão desses genes foram utilizados o kit Transia tube como triagem e o kit Ridascreen SET para a identificação das enterotoxinas clássicas (A-E). Um total de 76 isolados de *S. aureus* foram produtores de uma ou mais enterotoxinas clássicas e a presença dos genes *eea*, *eeb*, *eec*, *eed* ou *eee* confirmada pela PCR. Nove isolados foram enterotoxigênicos na triagem com o kit Transia tube, mas não pelo kit Ridascreen SET, ou seja, possivelmente, os isolados não produziam as enterotoxinas clássicas (A-E). Esses isolados, no entanto, apresentavam os genes *eeg*, *eeh* ou *eei*. Dez isolados enterotoxigênicos pelo kit de triagem Transia não apresentavam nenhum dos genes testados. Esses resultados sugerem reação cruzada, que pode ocorrer com kits de triagem que apresentam uma mistura de anticorpos para detecção, mas não identificação individual das enterotoxinas estafilocócicas clássicas (ROSEC; GIGAUD, 2002).

Determinados autores relataram a presença de genes responsáveis pela expressão de enterotoxinas em estafilococos coagulase negativa (ECN). Cunha *et al.* (2006) descreveram a presença de ECN enterotoxigênicos isolados de alimentos. Um estudo comparativo entre a PCR e as técnicas imunológicas ELISA, RPLA e OSP com isolados de ECN confirmou a importância de se associar uma técnica molecular às técnicas imunológicas na confirmação da enterotoxigenicidade dos ECN. Essa combinação é muito importante para avaliar a real importância deste grupo de estafilococos na epidemiologia da intoxicação alimentar estafilocócica (SANTOS, 2003).

A técnica de PCR permite a detecção de genes presentes nos isolados independente de sua expressão, ou seja, a presença do gene indica potencial tóxico, mas não indica e/ou assegura que o gene será expresso no alimento. A PCR transcriptase reversa (RT-PCR) é uma outra técnica molecular que pode ser utilizada para confirmar a expressão desses genes. A RT-PCR detecta sequências de RNAm responsáveis pela expressão das enterotoxinas estafilocócicas e não deixa dúvidas quanto ao potencial tóxico do isolado de *Staphylococcus* spp. analisado (FETSCH, 2017; VASCONCELOS *et al.*, 2011). Entretanto, a detecção de enterotoxina diretamente no alimento suspeito continua sendo importante para a comprovação laboratorial de intoxicação alimentar estafilocócica.

3.4 GENERALIDADES SOBRE PÃO DE QUEIJO

O pão de queijo é um derivado lácteo, tradicional da culinária mineira, consumido cada dia mais pelos brasileiros face às facilidades proporcionadas pelo processo de conservação da massa e custo relativamente baixo. A expansão deste produto no mercado extrapolou as fronteiras de Minas Gerais, e até mesmo do país e é exportado para diversos países como Estados Unidos, Inglaterra, Argentina, Alemanha, Itália, Espanha, Japão, entre outros (CORADO *et al.*, 2017). Atualmente, o Brasil conta com 500 indústrias de pão de queijo no Brasil, a maior parte em Minas Gerais (70%) com produção média de seis mil toneladas mensais (NOGUEIRA, 2018). Os ingredientes obrigatórios na formulação são: polvilho, leite ou água, queijo, óleo vegetal ou manteiga, ovos e sal. A quantidade de cada ingrediente ou a substituição de algum ingrediente por outro, varia de acordo com as características desejadas no produto final (ZAPATA *et al.*, 2019). Os fabricantes estão inovando para agregar valor ao produto, incorporando outros ingredientes à receita original, como bacon, salsicha, calabresa, parmesão, batata, iogurte, coalhada, requeijão, entre outros.

A RDC nº12 ANVISA, MS estabelece os padrões microbiológicos sanitários e determina os critérios para a conclusão e interpretação dos resultados das análises microbiológicas de alimentos destinados ao consumo humano. O grupo número vinte é denominado alimentos embalados e congelados e seu item B engloba pães, pizzas e outras massas parcialmente preparadas, condimentadas ou não, adicionadas de outros ingredientes ou não e similares, incluindo os pães de queijo. Os padrões sanitários estabelecidos para o pão de queijo pela legislação brasileira são: Coliformes a 45 °C, Estafilococos coagulase positiva, *Bacillus cereus* e *Salmonella* spp. Para Estafilococos coagulase positiva, a tolerância para a amostra indicativa é de $5,0 \times 10^3$ UFC por grama de pão de queijo. Para as amostras representativas, o número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente é cinco, sendo que o número máximo aceitável de amostras com contagens entre $1,0 \times 10^3$ UFC/g (m) e $5,0 \times 10^3$ UFC/g (M) é de duas (c). Valores acima de $5,0 \times 10^3$ UFC/g são inaceitáveis.

A contaminação de pão de queijo por microrganismos patogênicos pode ser proveniente da matéria-prima utilizada ou da falta de cuidados durante a fabricação. O queijo ingrediente básico utilizado na fabricação de pão de queijo, foi

associado a casos e surtos de intoxicação estafilocócica. Surtos dessa doença já foram relatados em Minas Gerais atribuídos ao consumo de queijo tipo minas artesanal contaminado (DORES *et al.*, 2013).

Resultados da avaliação microbiológica de marcas de pão de queijo congelado produzidas e comercializadas na região de Londrina mostraram contagens de *S. aureus* acima de $5,0 \times 10^3$ UFC/g em 100% das amostras estudadas (FERRARI; WINKLER; OLIVEIRA, 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Amostras de pão de queijo congelado de cinco indústrias da região de Londrina foram analisadas neste trabalho, totalizando 100 amostras. Foram analisadas 20 amostras de cada indústria. As amostras foram adquiridas entre março e julho de 2018 em cinco diferentes supermercados de Londrina, que comercializavam essas marcas de pão de queijo. Embalagens não violadas de 400 g de produto foram coletadas de maneira aleatória e transportadas, em caixa isotérmica em um prazo máximo de uma hora, para o laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná. As marcas foram denominadas de A, B, C, D e E, e os supermercados como 1, 2, 3, 4 e 5. Na tabela 2, está apresentado o número de amostras analisadas por marca e local de coleta.

Tabela 2. Número de amostras de pão de queijo congelado analisadas por marca e local de coleta

Supermercado	Marca A	Marca B	Marca C	Marca D	Marca E	Total
1	10	-	-	-	05	15
2	-	-	-	-	10	10
3	05	05	-	-	05	15
4	-	10	-	-	-	10
5	05	05	20	20	-	50
Total	20	20	20	20	20	100

4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

Alíquotas de 25 g de amostra foram pesadas assepticamente em sacos de homogeneização de amostras de 400 mL estéreis. A homogeneização das amostras foi realizada com 225 mL de água peptonada tamponada 0,1 % (Acumedia®, Michigan, USA) em homogeneizador (STOMACHER 400 Lab System, Seward, Norfolk, UK) por um minuto. A partir dessa diluição inicial de 10^{-1} , diluições decimais (10^{-2} e 10^{-3}) foram preparadas em tubos contendo 9,0 mL de água

peptonada tamponada 0,1 % estéril (Acumedia®, Michigan, USA).

4.3 CONTAGEM DE COLIFORMES E *E. coli*

A contagem de coliformes a 45 °C e de *E. coli* foi realizada como um critério adicional de avaliação das condições higiênico-sanitárias de fabricação do pão de queijo analisado no presente trabalho.

A contagem de coliformes foi realizada pelo método clássico do Número Mais Provável (NMP). Para pesquisa de coliformes a 35 °C, 1,0 mL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , preparadas conforme item 4.2, foram inoculadas em tubos contendo 9,0 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (Acumedia®, Michigan, USA) com tubos de durham invertidos. Após incubação por 24 h a 35 °C, os tubos com gás, considerados positivos, foram semeados em tubos contendo 9,0 mL de Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante (Acumedia®, Michigan, USA) e 9,0 mL de Caldo E.C. (Acumedia®, Michigan, USA), com tubos de durham invertidos, incubados por 24 h a 35 °C e a 45 °C, respectivamente. Os tubos de EC com gás, considerados positivos para coliformes a 45 °C foram semeados em placas contendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Himedia, Mumbai, Índia) incubadas a 35 °C por 24 horas. Colônias pretas com ou sem brilho metálico características de *Escherichia coli* foram selecionadas e realizadas as provas bioquímicas de Citrato de Simmons (Himedia, Mumbai, Índia), Indol (Acumedia®, Michigan, USA) e Tríplice Açúcar Ferro (Himedia, Mumbai, Índia). O cálculo do NMP de coliformes totais, de coliformes a 45 °C e de *E. coli* foi realizado utilizando a tabela de NMP (SILVA *et al.*, 2017).

4.4 CONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE *S. aureus*

O meio de cultura utilizado para a contagem de *S. aureus* foi o Ágar Baird-Parker (BP-Difco™, Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) preparado seguindo-se as especificações do fabricante e, após esterilização, acrescido de suspensão de gema de ovo com telurito de potássio (Laborclin, Pinhais-PR). Placas em duplicata de Ágar Baird-Parker foram inoculadas com 0,1 mL das diluições de 10^{-1} a 10^{-3} , preparadas conforme item 4.2. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Para a contagem foi utilizada a diluição em que as placas apresentaram de 30 a 100 colônias. Para a identificação bioquímica foram escolhidas três colônias

típicas e três atípicas por placa. Como colônias típicas de *Staphylococcus* spp. foram consideradas as colônias circulares, lisas, convexas, com 2 a 3 mm de diâmetro, negras com textura úmida, bordas esbranquiçadas e rodeadas por uma zona opaca e com ou sem um halo transparente. Como atípicas foram consideradas aquelas negras ou acinzentadas sem halos transparentes.

As colônias típicas e atípicas foram semeadas em ágar Manitol Salgado (Oxoid LTD, Basingstoke Hampshire, England) que foi incubado a 37 °C por 24 horas. A partir do crescimento em Manitol Salgado, foram realizadas as provas de identificação bioquímica: catalase, coagulase e DNase. Para a confirmação bioquímica do isolamento de *S. aureus*, os isolados coagulase positiva foram testados quanto à utilização aeróbia do manitol e utilização anaeróbia da maltose.

A contagem de *S. aureus* por grama de pão de queijo foi obtida utilizando-se a proporção das colônias selecionadas identificadas como *S. aureus* e a diluição correspondente da amostra.

4.5 CONFIRMAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *S. aureus* IDENTIFICADOS BIOQUIMICAMENTE

Isolados identificados bioquimicamente como *S. aureus*, conforme item 4.4, foram semeados em caldo BHI e incubados a 37 °C por 24 horas. As suspensões foram semeadas em ágar sangue preparado com ágar base (HIMEDIA, Índia) adicionado de 5% de sangue de carneiro. Após incubação por 24 horas a 37 °C, colônias circulares, convexas, com coloração branca a amarelada, com ou sem a formação de beta hemólise ao redor da colônia foram selecionadas para a confirmação molecular.

Para a identificação molecular dos isolados, o DNA bacteriano foi extraído conforme o item 4.6.1. Os oligonucleotídeos iniciadores Sa 442 (fragmento de 108 pb), específico de *S. aureus*, foi utilizado para a amplificação seguindo o protocolo de Martineau *et al.* (1998). A cepa USA 300 foi usada como controle positivo nesta análise. As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,5 mL, em volumes totais de 25 µL, contendo 20 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores Sa442-1 (5'-AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG-3'; posições 5 a 34) e Sa442-2 (5'-CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA-3'; posições 83 a 112), 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM dNTPs, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 1,5

mM de MgCl₂, e 3 µL de DNA. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, substituindo-se DNA por água ultrapura estéril. A amplificação foi realizada em termociclador (modelo PTC 100, MJ Research INC., Watertown, MA). Após 40 ciclos de 96 °C por três minutos, desnaturação a 95 °C por um segundo, pareamento e extensão dos oligonucleotídeos iniciadores a 55 °C por 30 segundos, os tubos foram resfriados a 4 °C. A análise dos produtos de amplificação foi realizada conforme o item 4.6.3.

4.6 DETECÇÃO DOS GENES *sea*, *seb*, *sec* E *sed* CODIFICADORES DAS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS A, B, C E D

A avaliação do potencial enterotoxigênico dos isolados de *S. aureus* provenientes das amostras de pão de queijo foi realizada através da detecção de genes codificadores das enterotoxinas estafilocócicas A, B, C e D, segundo Johnson *et al.* (1991) com modificações propostas por Cunha *et al.* (2006).

4.6.1 Extração de DNA

As suspensões das cepas de *S. aureus* isoladas de pão de queijo foram preparadas em tubos contendo caldo infusão cérebro coração (BHI) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e incubação a 37 °C por 24 horas. O Kit Illustra® (GE Healthcare) foi utilizado para a extração do DNA, que consiste na hidrólise enzimática das células de estafilococos com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL). A lisozima hidrolisa as ligações glicosídicas beta 1,4 entre resíduos do ácido N-acetilmurâmico e N-Acetil-D-glucosamina do peptídeoglicano, com a consequente desestabilização a parede celular bacteriana. A proteinase K é responsável pela hidrólise de proteínas celulares como nucleases. Essa hidrólise auxilia na lise celular e inativação de enzimas que degradam o DNA. Alíquotas de 500 µL da solução de lise foram adicionados à mistura e esta foi centrifugada a 5.000 x g por 1 minuto. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 11.000 x g por 1 minuto. A parte líquida foi descartada e 500 µL de solução de lise foram novamente adicionados à coluna. Após a centrifugação a 11.000 x g por 1 minuto e descarte da parte líquida, 500 µL da solução de lavagem foram adicionados à coluna e submetida à centrifugação a 11.000 x g por 3 minutos.

A seguir, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e 200 µL de água ultrapura aquecida a 70 °C foram utilizados para a eluição. As amostras foram centrifugadas a 5000 x g por 1 minuto, e a coluna desprezada. O DNA extraído foi armazenado a -20 °C, e utilizado posteriormente na PCR para a detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed*.

4.6.2 Condição da PCR

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,5 mL, em volumes totais de 25 µL, contendo 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM dNTPs, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 1,5 mM de MgCl₂, e 3 µL de DNA. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, substituindo-se DNA por água ultrapura estéril. A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research PTC-100 como descrito por Johnson *et al.* (1991) com modificações propostas por Cunha *et al.* (2006). O primeiro ciclo foi realizado a 94 °C por quatro minutos, desnaturação a 94 °C por dois minutos, pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores a 55 °C por dois minutos e extensão a 72 °C por um minuto e trinta segundos. Um segundo ciclo foi realizado com desnaturação a 94 °C por 2 minutos, pareamento a 53 °C por dois minutos e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. Um terceiro ciclo de 94 °C por 2 minutos, pareamento a 51 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos foi realizado e repetido por mais 37 vezes. Após os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72 °C por 7 minutos e posteriormente resfriados a 4 °C.

As seguintes linhagens padrão de *S. aureus* com genótipos conhecidos foram utilizadas como controles positivos: ATCC 13565 (gene *sea*), ATCC14458 (gene *seb*), ATCC 19095 (gene *sec*) e ATCC 23735 (gene *sed*). A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR e o tamanho dos produtos amplificados estão na tabela 3. *S. aureus* ATCC 25923 não enterotoxigênico foi utilizado como controle negativo (SOUZA *et al.*, 2016).

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR para detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* e tamanho dos produtos amplificados

Genes	Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência de oligonucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
<i>sea</i>	EEA 1	TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA	120
	EEA 2	GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA	
<i>seb</i>	EEB 1	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	478
	EEB 2	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	
<i>sec</i>	EEC 1	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	257
	EEC 2	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	
<i>sed</i>	EED 1	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT	317
	EED 2	TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG	

Fonte: Johnson *et al.* (1991)

4.6.3 Análise de Produtos de Amplificação

Após a PCR, cada microtubo contendo os produtos de amplificação foram adicionados de 4,0 µL de tampão de amostra (Ficoll 400 15%; azul de bromofenol 0,25%). Alíquotas de 10,0 µL dessa mistura foram analisadas em gel de agarose 2,0% acrescido de 0,02 µL/mL de SYBR® Safe 10.000 x em DMSO. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal com tampão Tris borato EDTA ((Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1,25 mM)) a 70 V durante setenta minutos. O marcador de massa molecular foi de 100 pares de bases (pb) e a visualização dos produtos de amplificação foi realizada por luz ultravioleta em transiluminador. O gel foi fotografado em sistema de fotodocumentação.

4.7 ESTUDO DA CAPACIDADE DE *S. aureus* PRODUTOR DE EEA EXPRESSAR A ENTEROTOXINA NA MASSA DE PÃO DE QUEIJO

4.7.1 Preparo do Inóculo

Suspensão de *S. aureus* ATCC 13565, produtor de EEA, foi preparada com o auxílio da escala nefelométrica de McFarland 0,5 para a obtenção de 8 log UFC/mL. A partir desta suspensão, foram realizadas diluições seriadas (1:10) em salina 0,85% e escolhida a melhor diluição para a contaminação da massa

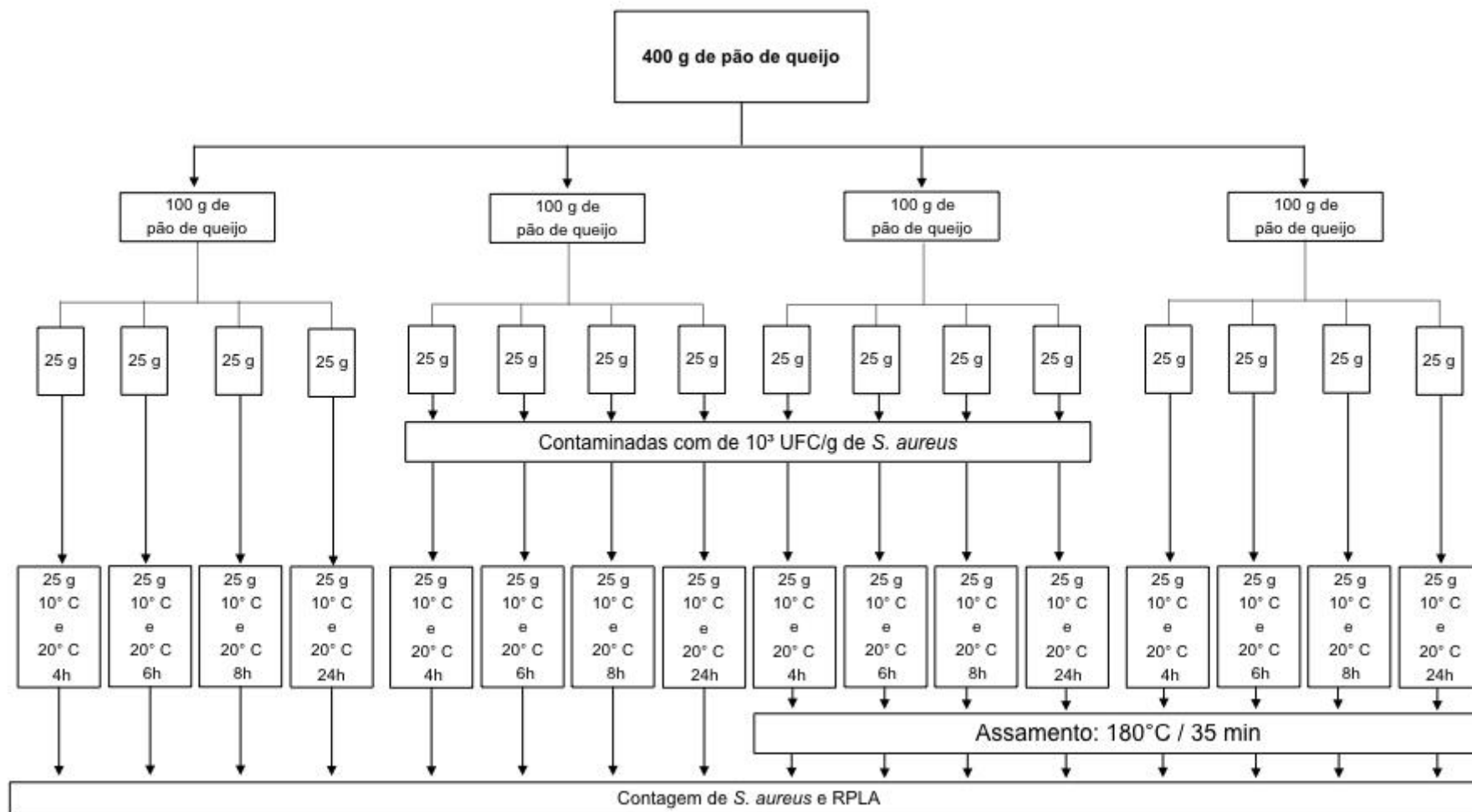
de pão de queijo com concentração final de 10^3 UFC/g. Para escolher a melhor diluição e confirmação do inóculo a ser utilizado na massa de pão de queijo foi realizada a contagem em gota, segundo Miles e Misra (1938), com modificações propostas por Silva *et al.* (2017), onde placas com ágar nutriente foram divididas em quadrantes e semeadas com 10 μ L das diluições, em triplicata. As placas foram deixadas em repouso, para a completa absorção do inóculo pelo meio e, em seguida incubadas a 37 °C por 24 horas.

4.7.2 Preparo da Massa de Pão de Queijo e contaminação com *S. aureus* produtor de EEA

Todos os ingredientes utilizados no preparo do pão de queijo foram previamente analisados, conforme o item 4.4, para confirmar a não contaminação dos ingredientes por *S. aureus*. A massa de pão de queijo foi preparada com 1000,0 g de polvilho azedo, 500,0 g de queijo minas padrão ralado, 350,0 mL de óleo de soja, 250,0 ml de leite, 5,0 ovos e 20,0 g de sal. O polvilho, sal e queijo minas padrão foram pesados. O leite e o óleo foram aquecidos até a fervura e depois despejados no polvilho. Esse processo é conhecido como escaldamento e promove a gelatinização do amido do polvilho. O polvilho escaldado foi resfriado à temperatura de 25 °C e adicionado dos ovos, sal e queijo ralado. A mistura e a sovação da massa de pão de queijo foi realizada manualmente com todos os cuidados assépticos para evitar contaminação da massa.

Conforme a figura 1, a massa de pão de queijo foi dividida em quatro porções contendo aproximadamente 100,0 g cada. Duas porções de 100,0 g foram subdivididas em quatro porções de 25,0 g, que foram contaminadas individualmente com suspensão de *S. aureus* ATCC 13565, produtor de EEA na concentração aproximada de 10^3 UFC/g. Duas das porções de 100 g não contaminadas foram subdivididas em quatro porções de 25,0 g e foram consideradas como controles negativos, sendo que uma delas foi assada. As porções de 25 g contaminadas e não contaminadas foram mantidas a 10 °C e a 20 °C por 4, 6, 8 e 24 horas. Após esse período de incubação as porções foram analisadas conforme item 4.8. O experimento foi realizado em duplicata.

Figura 1. Fluxograma da contaminação das amostras de pão de queijo com *S. aureus* ATCC 13565, produtor de EEA. O experimento foi realizado em duplicata e repetido duas vezes



4.8 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE *S. aureus* ENTEROTOXIGÊNICO PRODUZIR ENTEROTOXINA A NA MASSA PÃO DE QUEIJO ANTES E APÓS O ASSAMENTO

Quatro amostras de pão de queijo de 25 g contaminadas com *S. aureus* produtor de EEA, conforme item 4.7.1, foram incubadas a 10 °C. Após 4 h de incubação, uma amostra de 25 g foi homogeneizada com 50 mL de solução salina 0,85 % estéril para a extração da toxina. O mesmo procedimento foi realizado após, 6, 8 e 24 h de incubação. Alíquotas de 30 mL dos homogeneizados foram centrifugados a 900 x G a 4 °C por 30 minutos (Eppendorf AG, Germany). Os sobrenadantes foram filtrados em membrana Millipore 0,45 µm, centrifugados a 900 x G a 4 °C por 30 minutos e posteriormente filtrados em membrana Millipore 0,2 µm. Os filtrados foram utilizados para a detecção de EEA empregando a técnica de “*Reversed Passive Latex Agglutination*” (SET-RPLA - Denka Seiken Ltda, Tóquio, Japan).

Microplacas de poliestireno com fundo em V com 96 poços (Greiner Bio-one, Americana-SP) foram utilizadas para os ensaios de aglutinação, que foi realizada seguindo as instruções do fabricante e estão ilustrados na figura 2.

Figura 2. Ilustração da microplaca em V na qual foi realizado o ensaio RPLA com as amostras de pão de queijo contaminadas com 10^3 UFC/g de *S. aureus* e incubadas a 10 °C e 20 °C por 4, 6, 8 e 24 horas, antes e após o assamento

	1 ¹	2 ²	3 ¹	4 ²	5 ¹	6 ²	7 ¹	8 ²	9	10	11	12
A	25 µL de filtrado (4 h) + 25 µL de diluente	25 µL de filtrado (4 h) + 25 µL de diluente	25 µL de filtrado (6 h) + 25 µL de diluente	25 µL de filtrado (6 h) + 25 µL de diluente	25 µL de filtrado (8 h) + 25 µL de diluente	25 µL de filtrado (8 h) + 25 µL de diluente	25 µL de filtrado (24 h) + 25 µL de diluente	25 µL de filtrado (24 h) + 25 µL de diluente	25 µL de látex controle + 25 µL de Filtrado (24h)	25 µL de látex controle + 25 µL de Filtrado (24h)	-	-
B	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de látex controle	25 µL de látex controle	-	-
C	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de látex controle	25 µL de látex controle	-	-
D	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de látex controle	25 µL de látex controle	-	-
E	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de látex controle	25 µL de látex controle	-	-
F	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de látex controle	25 µL de látex controle	-	-
G	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de diluente	25 µL de látex controle	25 µL de látex controle	-	-
H	25 µL de EEA + 25 µL de látex anti-EEA	25 µL de EEA + 25 µL de látex anti-EEA	25 µL de diluente + 25 µL de látex anti-EEA	25 µL de diluente + 25 µL de látex anti-EEA	-	-	-	-	-	-	-	-

Diluição 1:2
(transferência de 25 µl da mistura)



¹ Filtrados de amostras de pão de queijo contaminadas, incubadas a 10 °C e 20 °C por 4, 6, 8 e 24 horas

² Filtrados de amostras de pão de queijo contaminadas, incubadas a 10 °C e 20 °C por 4, 6, 8 e 24 horas e assadas

As microplacas foram organizadas em doze colunas (1 a 12) e oito linhas (A a H). Alíquotas de 25 µL do diluente de amostras, fornecido pelo kit RPLA, foram adicionados em todos os poços selecionados, com exceção dos poços 1H e 2H utilizados para o teste com o controle positivo. Alíquotas de 25 µL dos filtrados preparados a partir das amostras incubadas a 10 °C por 4, 6, 8 e 24 h, antes do assamento, foram adicionados nos poços 1A, 3A, 5A e 7A, respectivamente. Alíquotas de 25 µL dos filtrados preparados a partir das amostras incubadas a 10 °C por 4, 6, 8 e 24 h, após o assamento, foram adicionados nos poços 2A, 4A, 6A e 8A, respectivamente. Diluições seriadas dos filtrados foram realizadas nos poços das colunas 1G a 8G.

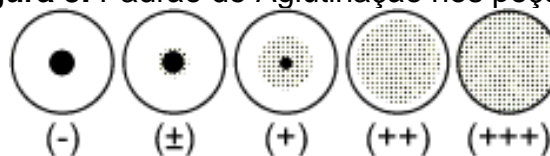
Em todos os poços das linhas 1 a 8 e das colunas de A a G, foram adicionadas 25 µL do látex sensibilizado com anti-EEA. Para controle positivo os poços 1H e 2H foram adicionados de 25 µL de enterotoxina EEA, fornecida pelo Kit RPLA e 25 µL do látex sensibilizado com anti-EEA. Nos poços 3H e 4H foram adicionados 25 µL do látex sensibilizado com EEA.

Nos poços 9A a 10A foram adicionados 25 µL do filtrado preparado a partir da amostra incubada a 10 °C por 24 h, antes e após o assamento, respectivamente. Diluições seriadas foram realizadas até os poços 9G e 10 G, respectivamente. Nesses poços foram adicionados 25 µL do látex controle, fornecido pelo kit RPLA e foi utilizado como controle de reação inespecífica do látex com a matriz alimentar.

O mesmo ensaio de aglutinação foi realizado com os filtrados preparados a partir das amostras de pão de queijo contaminadas e não contaminadas e incubadas a 20 °C por 4, 6, 8 e 24 h, antes e após o assamento. Os ensaios foram repetidos duas vezes em dias diferentes.

A microplaca foi tampada, colocada em câmara úmida e incubada em temperatura ambiente por 20 a 24 horas. A leitura dos resultados foi realizada de acordo com o padrão de aglutinação fornecida pelo kit RPLA, e apresentada na figura abaixo.

Figura 3. Padrão de Aglutinação nos poços



Fonte: Oxoid (2019)

Os poços semelhantes aos resultados classificados como (+), (++) e (+++) foram considerados positivos. Para as demais situações os resultados foram considerados negativos (OXOID, 2019).

4.9 AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA A APÓS O PROCESSAMENTO TÉRMICO DO PÃO DE QUEIJO

Amostras de pão de queijo de 25 g (esferas com 3,0 cm de diâmetro e 1,0 cm de altura) contaminadas com *S. aureus* produtor de enterotoxinas A e incubadas conforme item 4.8 (Figura 1). Foram colocadas na mesma bandeja e levadas ao forno a 180°C por 35 minutos. As esferas assadas foram avaliadas utilizando SET- RPLA, conforme item 4.8 para verificar se as enterotoxinas estafilocócicas foram degradadas pelo processamento térmico. A contagem de *S. aureus* dos pães de queijo assados foi realizada, conforme item 4.4, para confirmar a ausência de células viáveis de *S. aureus*.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da contagem de *S. aureus* em UFC/g em massa de pão de queijo incubada a 10 °C e 20 °C por 4, 6, 8 e 24 horas, foram organizados em delineamento fatorial 2 x 4 (temperatura de incubação x tempo de incubação), foram comparados, utilizando análise de variância e o teste de médias (teste de Tukey, $p < 0,05$). As análises foram realizadas utilizando o software R R - 3.6.0 (32 bits) (Boston, MA, USA) e a planilha eletrônica Microsoft® Excel® 2010, versão 14.0.6112.5000 (32 bits) (Microsoft Corporation).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussão estão apresentados na forma de artigo, que será submetido à publicação em revista científica “Journal Food Safety”.

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Exposição às enterotoxinas estafilocócicas em pão de queijo

EXPOSIÇÃO ÀS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS EM PÃO DE QUEIJO

RESUMO

O pão de queijo é uma iguaria mineira consumida mundialmente. Por ser um produto perecível e apresentar grande manuseio durante as etapas de produção, está sujeito à contaminação, sobrevivência e multiplicação de microrganismos, que são capazes de causar toxinfecções alimentares. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em pão de queijo congelado e avaliar o perigo deste causar intoxicação. Cem amostras de pães de queijo congelados produzidas por indústrias de Londrina, PR. A confirmação da presença de *S. aureus* foi realizada por identificação bioquímica e molecular. A detecção de genes codificadores das enterotoxinas estafilocócicas clássicas (A, B, C e D) foi realizada nos isolados de *S. aureus* pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a avaliação da possibilidade da produção de enterotoxina estafilocócica A (EEA) em pão de queijo, a massa foi contaminada com *S. aureus American Type Culture Collection* (ATCC) (13565) e incubada a 10 °C e 20 °C por 4, 6, 8 e 24 h. A detecção de EEA na massa de pão de queijo contaminada, antes e após o assamento a 180 °C por 35 minutos foi realizada empregando a técnica de “*reversed passive latex agglutination*” (RPLA). Todas as amostras analisadas apresentaram contagem de coliformes a 45°C e de *Escherichia coli* abaixo dos limites tolerados pela legislação brasileira. Das 100 amostras analisadas, 40 amostras (40%) estavam contaminadas com *S. aureus*, sendo que 27 (27%) estavam contaminadas com contagens acima de $5,0 \times 10^3$ UFC/g, que é o limite tolerado pela legislação. Na avaliação molecular de 62 cepas de *S. aureus* isoladas das amostras de pão de queijo nenhuma apresentou os genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed*. EEA foi produzida nas amostras de pães de queijo contaminadas com *S. aureus* ATCC 13565 após 8 e 24 h de incubação a 10 °C e 20 °C. EEA foi detectada nas amostras incubadas por 8 e 24 h de incubação a 10 °C e 20 °C 24 horas após o assamento a 180 °C por 35 min. Os resultados obtidos nesse trabalho comprovam, que se forem dadas condições favoráveis, EEA pode ser produzida na massa de pão de queijo. Os resultados também sugerem que, dependendo da quantidade de enterotoxina presente na massa, essa pode manter a sua atividade imunológica após o assamento do pão de queijo. Fica evidente a necessidade do controle das matérias-primas utilizadas e das medidas que previnam a multiplicação de *S. aureus* durante a fabricação e conservação da massa do pão de queijo.

Palavras-chave: Pão de queijo; Enterotoxina estafilocócica; *Staphylococcus aureus*.

1. INTRODUÇÃO

Devido a elevada aceitação, a oferta de pão de queijo congelado em redes de varejo aumentou nos últimos anos permitindo o consumo no mundo todo (GRANZA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2017; ZAPATA *et al.*, 2019). Outrossim, trata-se de um produto perecível, sujeito a constante manuseio e possibilita a contaminação, sobrevivência e multiplicação de micro-organismos capazes de causar toxinfecção alimentar. A contaminação pode ser proveniente da matéria-prima ou da falta de cuidados durante a fabricação.

Entre os patógenos capazes de contaminar a massa do pão de queijo destaca-se o *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico. O vestíbulo nasal humano é o principal habitat natural de *S. aureus*, propagando outros sítios anatômicos (FORSYTHE, 2013).

No Brasil, entre 2000 e 2017, foram reportados 12.660 surtos alimentares, com 2.372.132 indivíduos expostos, 239.164 doentes e 186 óbitos. *S. aureus* foi identificado como agente etiológico em 18,2 % dos surtos neste período (BRASIL, 2019). Em 2017, o *European Food Safety Authority/European Center for Disease Prevention and Control* reportou a contaminação de diferentes alimentos com enterotoxina estafilocócica, produzidos por diferentes países europeus.

A intoxicação ocorre após a ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas no alimento. Existem vinte e três enterotoxinas sorologicamente distintas classificadas como eméticas (EEA, EEB, EEC, EED, EEE, EEG, EEH, EEI, EELK, EELL, EELM, EELN, EELO, EELP, EELQ, EER, EES, EET) e não-eméticas (EELJ, EELU, EELV, EELX E EELW) (FISCHER; OTOODENAYER *et al.*, 2017; OMOE *et al.*, 2017; SEO, 2016; SILVA *et al.*, 2017), sendo 95% das intoxicações estafilocócicas causadas pela EEA, EEB, EEC, EED e EEE, enquanto, o restante é causado por EEG, EEI, EEM, EEN e EEO (BENCARDINO; VITALI, 2018; PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010; SILVA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2015).

Temperaturas e tempos de cocção utilizados em rotinas domésticas e industriais podem não ser suficientes para a inativação das enterotoxinas (FDA, 2012; FORSYTHE, 2013; NECIDOVÁ *et al.*, 2016, NECIDOVÁ *et al.*, 2019). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece a tolerância de $5,0 \times 10^3$ UFC/g de estafilococos coagulase positiva (RDC nº12, ANVISA).

2. O trabalho avaliou a ocorrência de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em pão de queijo congelado comercializado na cidade de Londrina-PR e o perigo de pão de queijo causar intoxicação estafilocócica.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta das Amostras

Um total de 100 amostras de pães de queijo congelados de cinco indústrias da região de Londrina foram analisadas, sendo 20 de cada indústria. As amostras foram adquiridas entre março e julho de 2018 em cinco diferentes supermercados de Londrina, que comercializavam essas marcas de pão de queijo. Embalagens não violadas de 400 g do produto foram coletadas aleatoriamente e transportadas, em caixa isotérmica em um prazo máximo de uma hora, para o laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná. As marcas foram codificadas de A, B, C, D e E, e os supermercados como 1, 2, 3, 4 e 5. Na tabela 1 está apresentado o número de amostras analisadas por marca e local de coleta.

Tabela 1. Número de amostras de pão de queijo congelado analisadas por marca e local de coleta

Supermercado	Marca A	Marca B	Marca C	Marca D	Marca E	Total
1	10	-	-	-	05	15
2	-	-	-	-	10	10
3	05	05	-	-	05	15
4	-	10	-	-	-	10
5	05	05	20	20	-	50
Total	20	20	20	20	20	100

2.2 Preparo das Amostras

Alíquotas de 25 g de amostra foram pesadas assepticamente em sacos de homogeneização de amostras de 400 mL estéreis. A homogeneização das amostras foi realizada com 225 mL de água peptonada tamponada 0,1% (Acumedia®, Michigan, USA) em homogeneizador (STOMACHER 400 Lab System, Seward, Norfolk, UK) por um minuto. A partir dessa diluição inicial de 10^{-1} , diluições decimais (10^{-2} e 10^{-3}) foram preparadas em tubos contendo 9,0 mL de água peptonada tamponada 0,1% estéril (Acumedia®, Michigan, USA).

2.3 Contagem de Coliformes e *E. coli*

A contagem de coliformes foi realizada pelo método clássico do Número Mais Provável (NMP), conforme Silva *et al.* (2017), com modificações. Para pesquisa de

coliformes totais e a 45 °C foram utilizadas as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , preparadas conforme item 2.2 e o meio de cultura Caldo Lauril Sulfato Triptose (Acumedia®, Michigan, USA), Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante (Acumedia®, Michigan, USA) e Caldo E.C. (Acumedia®, Michigan, USA). Os tubos de EC com gás, considerados positivos para coliformes a 45 °C foram semeados em placas contendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Himedia, Mumbai, Índia) incubadas a 35 °C por 24 horas. Colônias pretas com ou sem brilho metálico características de *Escherichia coli* foram selecionadas e realizadas as provas bioquímicas de Citrato de Simmons (Himedia, Mumbai, Índia), Indol (Acumedia®, Michigan, USA) e Tríplice Açúcar Ferro (Himedia, Mumbai, Índia). O cálculo do NMP de coliformes totais, de coliformes a 45 °C e de *E. coli* foi realizado utilizando a tabela de NMP (SILVA *et al.*, 2017).

2.4 Contagem, Identificação Bioquímica e Confirmação Molecular de *S. aureus*

Placas em duplicata de Ágar Baird-Parker (BP-Difco™, Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) foram inoculadas com 0,1 mL das diluições de 10^{-1} a 10^{-3} , preparadas conforme item 2.2. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Para a contagem foi utilizada a diluição em que as placas apresentaram de 30 a 100 colônias. Para a identificação bioquímica foram escolhidas três colônias típicas (circulares, lisas, convexas, com 2 a 3 mm de diâmetro, negras com textura úmida, bordas esbranquiçadas e rodeadas por uma zona opaca e com ou sem um halo transparente) e três atípicas (negras ou acinzentadas com ou sem halos transparentes). As colônias típicas e atípicas foram semeadas em ágar Manitol Salgado (Oxoid LTD, Basingstoke Hampshire, England) que foi incubado a 37 °C por 24 horas. A partir do crescimento em Manitol Salgado, foram realizadas as provas de identificação bioquímica: catalase, coagulase e DNase. Os isolados coagulase positiva foram testados quanto à utilização aeróbia do manitol e utilização anaeróbia da maltose para a confirmação bioquímica de *S. aureus*.

A contagem de *S. aureus* por grama de pão de queijo foi obtida utilizando-se a proporção das colônias selecionadas identificadas como *S. aureus* e a diluição correspondente da amostra.

2.5 Confirmação Molecular dos Isolados de *S. aureus* Identificados Bioquimicamente

Isolados identificados bioquimicamente como *S. aureus*, conforme item 2.4,

foram semeados em caldo BHI e incubação a 37 °C por 24 horas. As suspensões foram semeadas em ágar sangue preparado com ágar base (HIMEDIA, Índia) adicionado de 5 % de sangue de carneiro. Após incubação por 24 horas a 37 °C, colônias circulares, convexas, com coloração branca a amarelada, com ou sem a formação de beta hemólise ao redor da colônia foram selecionadas para a confirmação molecular.

A identificação molecular dos isolados foi realizada seguindo o protocolo de Martineau *et al.* (1998). A cepa USA 300 foi usada como controle positivo.

2.6 Detecção dos Genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* em Cepas de *S. aureus* Isoladas das Amostras de Pão de Queijo

A detecção de genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* foi realizada com as cepas isoladas das amostras de pão de queijo analisadas neste trabalho. A extração do DNA, as condições da PCR e a análise dos produtos de amplificação seguiram o descrito por Johnson *et al.* (1991), com modificações propostas por Cunha *et al.* (2006).

As seguintes linhagens padrão de *S. aureus* com genótipos conhecidos foram utilizadas como controles positivos: ATCC 13565 (gene *eea*), ATCC14458 (gene *eeb*), ATCC 19095 (gene *eec*) e ATCC 23735 (gene *eed*). A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR e o tamanho dos produtos amplificados. *S. aureus* ATCC 25923 não enterotoxigênico foi utilizado como controle negativo (SOUZA *et al.*, 2016).

2.7 Estudo da Capacidade de *S. aureus* Produtor de EEA Expressar a Enterotoxina na Massa de Pão de Queijo

2.7.1 Preparo do Inóculo

Suspensão de *S. aureus* ATCC 13565, produtor de EEA, foi preparada com o auxílio da escala nefelométrica de McFarland 0,5 para a obtenção de 8 log UFC/mL. A partir desta suspensão, foram realizadas diluições seriadas (1:10) em salina 0,85% e escolhida a melhor diluição para a contaminação da massa de pão de queijo com concentração final de 103 UFC/g. Para escolher a melhor diluição e confirmação do inóculo a ser utilizado na massa de pão de queijo foi realizada a contagem em gota, segundo Miles e Misra (1938), com modificações propostas por Silva *et al.* (2017), onde placas com ágar nutriente foram

divididas em quadrantes e semeadas com 10 µL das diluições, em triplicata. As placas foram deixadas em repouso, para a completa absorção do inóculo pelo meio e, em seguida incubadas a 37 °C por 24 horas.

2.7.2 Preparo da Massa de Pão de Queijo e contaminação com *S. aureus* produtor de EEA

Todos os ingredientes utilizados no preparo do pão de queijo foram previamente analisados, conforme o item 2.4, para confirmar a não contaminação dos ingredientes por *S. aureus*. A massa de pão de queijo foi preparada com 1000,0 g de polvilho azedo, 500,0 g de queijo minas padrão ralado, 350,0 mL de óleo de soja, 250,0 ml de leite, 5,0 ovos e 20,0 g de sal. O polvilho, sal e queijo minas padrão foram pesados. O leite e o óleo foram aquecidos até a fervura e depois despejados no polvilho. Esse processo é conhecido como escaldamento e promove a gelatinização do amido do polvilho. O polvilho escaldado foi resfriado à temperatura de 25 °C e adicionado dos ovos, sal e queijo ralado. A mistura e a sovação da massa de pão de queijo foi realizada manualmente com todos os cuidados assépticos para evitar contaminação da massa.

A massa de pão de queijo foi dividida em quatro porções contendo aproximadamente 100,0 g cada. Duas porções de 100,0 g foram subdivididas em quatro porções de 25,0 g, que foram contaminadas individualmente com suspensão de *S. aureus* ATCC 13565, produtor de EEA na concentração aproximada de 10^3 UFC/g. Duas das porções de 100 g não contaminadas foram subdivididas em quatro porções de 25,0 g e foram consideradas como controles negativos, sendo que uma delas foi assada. As porções de 25 g contaminadas e não contaminadas foram mantidas a 10 °C e a 20 °C por 4, 6, 8 e 24 horas. Após esse período de incubação as porções foram analisadas conforme item 4.8. O experimento foi repetido duas vezes.

2.8 Avaliação da Capacidade de *S. aureus* Enterotoxigênico Produzir Enterotoxina A na Massa de Pão de Queijo Antes e Após o Assamento

Quatro amostras de pão de queijo de 25 g contaminadas com *S. aureus* produtor de EEA, conforme item 2.7, foram incubadas a 10 °C. Após 4 h de incubação, uma amostra de 25 g foi homogeneizada com 50 mL de solução salina 0,85 % estéril para a extração da toxina. O mesmo procedimento foi realizado após, 6, 8 e 24 h de incubação. Alíquotas de 30 mL dos homogeneizados foram centrifugados a 900 x G a 4 °C por 30 minutos (Eppendorf

AG, Germany). Os sobrenadantes foram filtrados em membrana Millipore 0,45 μm e posteriormente em membrana Millipore 0,2 μm . Os filtrados foram utilizados para a detecção de EEA empregando a técnica de “*Reversed Passive Latex Agglutination*” (SET-RPLA - Denka Seiken Ltda, Tóquio, Japan).

Microplacas de poliestireno com fundo em V com 96 poços (Greiner Bio-one, Americana-SP) foram utilizadas para os ensaios de aglutinação, que foram realizados seguindo as instruções do fabricante. A leitura dos resultados foi realizada de acordo com o padrão de aglutinação especificado nas instruções do kit-RPLA, após incubação das microplacas em temperatura ambiente por 20 a 24 horas.

2.9 Avaliação da Inativação de Enterotoxina Estafilocócica A após o Processamento Térmico do Pão de Queijo

Amostras de pão de queijo de 25 g (esferas com 3,0 cm de diâmetro e 1,0 cm de altura) contaminadas com *S. aureus* produtor de enterotoxinas A e incubadas conforme item 2.8. foram colocadas na mesma bandeja e levadas ao forno a 180 °C por 35 minutos. As esferas assadas foram avaliadas utilizando SET- RPLA, conforme item 2.8 para verificar se as enterotoxinas estafilocócicas foram degradadas pelo processamento térmico. A contagem de *S. aureus* dos pães de queijo assados foi realizada, conforme item 2.4, para confirmar a ausência de células viáveis de *S. aureus*.

2.10 Análise Estatística

Os dados da contagem de *S. aureus* em UFC/g em massa de pão de queijo incubada a 10 °C e 20 °C por 4, 6, 8 e 24 horas, foram organizados em delineamento fatorial 2 x 4 (temperatura de incubação x tempo de incubação), foram comparados, utilizando análise de variância e o teste de médias (teste de Tukey, $p < 0,05$). As análises foram realizadas utilizando o software R R - 3.6.0 (32 bits) (Boston, MA, USA) e a planilha eletrônica Microsoft® Excel® 2010, versão 14.0.6112.5000 (32 bits) (Microsoft Corporation).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação Microbiológica das Amostras de Pão de Queijo

A legislação brasileira não tem um regulamento técnico de identidade e qualidade de pão de queijo, tampouco parâmetros microbiológicos específicos para avaliar a presença de *S. aureus* enterotoxigênicos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS) estabelece a tolerância de $5,0 \times 10^3$ UFC/g de estafilococos coagulase positiva (RDC nº12, ANVISA, MS).

A tabela 2 apresenta a contagem de *S. aureus* realizada neste trabalho com 100 amostras de pão de queijo. Um total de 60 amostras (60,0 %) apresentou contagem inferior a $1,0 \times 10^2$ UFC/g, ou seja, *S. aureus* não foi isolado dessas amostras. Das 40 amostras (40,0 %) contaminadas com *S. aureus*, 27 (27,0 %) apresentaram contagens superiores a $5,0 \times 10^3$ UFC/g, que é o limite tolerado pela RDC nº 12 (ANVISA, MS).

Tabela 2. Resultados da contagem de *S. aureus* nas amostras de pão de queijo congelado por cada marca analisada

Intervalo de Contagem (UFC/g)	Marca A n (%)	Marca B n (%)	Marca C n (%)	Marca D n (%)	Marca E n (%)
* $< 1,0 \times 10^2$	13 (65,0)	14 (70,0)	3 (15,0)	13 (65,0)	17 (85,0)
** $1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
*** $1,0 \times 10^3 - 5,0 \times 10^3$	2 (10,0)	2 (10,0)	3 (15,0)	3 (15,0)	2 (15,0)
**** $> 5,0 \times 10^3$	5 (25,0)	4 (20,0)	13 (65,0)	4 (20,0)	1 (5,0)
Total	20 (100,0)	20 (100,0)	20 (100,0)	20 (100,0)	20 (100,0)

* Limite de detecção da análise.

** Intervalo de contagem entre limite de detecção da análise e amostra aceitável.

*** Intervalo de contagem entre amostra aceitável e amostra intermediária aceitável.

**** Amostra imprópria ao consumo.

Vinte amostras de cada marca de pão de queijo foram analisadas e 13 amostras (65,5 %) da marca C estavam contaminadas com contagens acima do limite tolerado, enquanto que cinco (25,0 %), quatro (20,0 %), quatro (20,0 %) e uma (5,0 %) amostra das marcas A, B, D e E apresentaram contagens acima de $5,0 \times 10^3$ UFC/g, respectivamente.

Pouca informação está disponível sobre a contaminação de pão de queijo congelado comercializado no Brasil. Resultados sobre a avaliação microbiológica de marcas de pão de queijo produzidas e comercializadas em Londrina, PR mostraram que todas as amostras analisadas apresentavam contagens de *S. aureus* acima do tolerado pela RDC nº 12

(ANVISA, MS) (FERRARI; WINKLER; OLIVEIRA, 2007).

A contagem de coliformes a 45°C e de *E. coli* foi realizada como um critério adicional de avaliação das condições higiênico-sanitárias de fabricação do pão de queijo analisado neste trabalho. Vinte e cinco amostras (25,0 %) estavam contaminadas com coliformes a 45 °C e 17 (17,0 %) com *E. coli*, no entanto, apresentaram contagens abaixo de $5,0 \times 10^2$ NMP/g, considerado o limite máximo tolerado pela RDC nº 12 (ANVISA, MS).

S. aureus é a principal espécie associada à intoxicação estafilocócica, embora a produção de enterotoxinas já tenha sido relatada por outras espécies coagulase positiva e negativa (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010). Nenhuma das 62 cepas de *S. aureus* isoladas das 40 amostras de pão de queijo analisadas apresentaram os genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, responsáveis pela expressão da EEA, EEB, EEC e EED, respectivamente. Outros trabalhos, no entanto, já relataram a detecção de genes responsáveis pela expressão das enterotoxinas estafilocócicas em cepas de *S. aureus* isoladas de diferentes alimentos em vários países (CHAO *et al.*, 2015; CHENG *et al.*, 2016; MANSOUR *et al.*, 2017; NUNES *et al.*, 2016; SAKA; TERZI; GULEL, 2018).

É importante ressaltar que neste trabalho foi realizada a pesquisa de quatro genes responsáveis pela expressão de quatro das enterotoxinas clássicas. Várias amostras analisadas estavam contaminadas com *S. aureus* e como existem 23 enterotoxinas estafilocócicas identificadas, não é possível descartar a presença de cepas com outros genes responsáveis pela expressão de EEE e das enterotoxinas estafilocócicas não-clássicas.

Umeda *et al.*, (2017) confirmaram através de resultados epidemiológicos e investigações laboratoriais que o *S. aureus* foi o responsável pelo surto alimentar ocorrido em um almoço, num asilo, em Osaka, no Japão. Os isolados de *S. aureus*, oriundos de swabs nasais de manipuladores, fezes dos afetados e restos de alimentos, apresentaram os genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* e *selu*, mas não continham os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*, e não expressaram nenhuma enterotoxina clássica. Os genes presentes foram associados como responsáveis pelo surto. A limitação deste estudo foi à impossibilidade de confirmar a expressão destes genes no alimento e isolados através de ensaios imunológicos. Quando isso for possível esse e muitos outros surtos poderão ser esclarecidos e enterotoxinas não-clássicas poderão ser reportadas como causadoras de surtos alimentares.

Um surto alimentar associado ao consumo de queijo de cabra contaminado com $2,6 \times 10^3$ UFC/g de *S. aureus* ocorreu no Ticino, Suíça. Nenhuma enterotoxina clássica (EEA-EEE) foi detectada nas amostras de queijo, entretanto, detectaram genes de *seg*, *sei*, *sem*, *sen* e *seo* nestes isolados, esses genes foram associados como responsáveis pelo surto (JOHLER *et*

al., 2015).

A intoxicação estafilocócica ocorre após a ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas no alimento. Em 2017, o *European Food Safety Authority/European Center for Disease Prevention and Control* reportou a contaminação de diferentes alimentos com enterotoxina estafilocócica, produzidos por diferentes países europeus. A percentagem de alimentos contaminados foi diferente, dependendo do país de origem dos alimentos.

Surtos de intoxicação estafilocócica foram reportados em vários países devido a leite e derivados contaminados com diferentes enterotoxinas estafilocócicas clássicas (HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012). O surto como maior número de casos já reportado (13.420) ocorreu no Japão com diferentes derivados de leite fabricados com leite em pó desnatado contaminado. O leite estava contaminado com 0,38 ng/g de EEA e o leite em pó com aproximadamente 3,7 ng/g de EEA (ASAO *et al.*, 2003).

A presença de enterotoxina estafilocócica na massa do pão de queijo pode ser devida a ingredientes contaminados ou a produção da enterotoxina durante a fabricação do produto. A contagem de *S. aureus* acima do tolerado pela legislação em 27,0 % das amostras analisadas neste trabalho indica falhas nas Boas Práticas de Fabricação (BPF's) utilizadas. *S. aureus* pode causar mastite clínica e sub-clínica em bovinos e contaminar o leite e derivados (FORSYTHE, 2013). O queijo, ingrediente básico utilizado na fabricação de pão de queijo, foi associado a casos e surtos de intoxicação estafilocócica. Surtos dessa doença já foram relatados em Minas Gerais atribuídos ao consumo de queijo tipo minas artesanal contaminado (DORES *et al.*, 2013). Surtos já foram reportados evidenciando falhas no controle da temperatura durante a fabricação de diferentes alimentos. Sobremesa com chantilly contaminada com $3,4 \times 10^8$ UFC/g de estafilococos coagulase positiva e 2,12 ng/g de EEA foi associada a um surto que aconteceu com clientes de um restaurante na Umbria, Itália. O armazenamento inadequado da sobremesa à temperatura ambiente por 5 horas possibilitou a multiplicação de *S. aureus* enterotoxigênico e a produção de EEA (ERCOLI *et al.*, 2017). Babic *et al.* (2018) observaram que a manutenção de leite em temperaturas inferiores a 8 °C durante toda a cadeia de produção e comercialização do leite diminui estatisticamente o risco de *S. aureus* se multiplicar no produto, expressar e sintetizar enterotoxinas.

O vestíbulo nasal do ser humano é o principal habitat natural de *S. aureus*, que pode contaminar outros sítios anatômicos, como as mãos. Essa, portanto, pode ser uma via de transmissão dessa bactéria para o pão de queijo, principalmente, no caso de pequenas indústrias. O consumo de alimentos contaminados por manipuladores, que armazenaram os

alimentos em temperatura ambiente por 24 horas, após o preparo, permitiu a multiplicação de *S. aureus* e a expressão de toxinas, resultando em um surto de intoxicação estafilocócica ocorrido em Minas Gerais, Brasil, com 4.000 casos e 16 óbitos (DO CARMO *et al.*, 2004) e em Umbria, Itália, concluiu-se que uma manipuladora foi a fonte de contaminação de um surto envolvendo sobremesa com *chantilly* (ERCOLI *et al.*, 2017). Outro surto ocorreu após o grande terremoto que aconteceu no centro da Itália em 2017. Ficou comprovado que as cepas de *S. aureus* de biótipo humano isoladas da salada de macarrão, envolvida pelo surto, eram provenientes da mesma fonte humana (GUIDI *et al.*, 2018). Os casos acima reforçam a necessidade de educação continuada de manipuladores de alimentos para diminuir o risco de intoxicação estafilocócica.

3.2 Estudos da Capacidade de *S. aureus* Produtor de EEA Expressar Toxina na Massa de Pão de Queijo

O estudo da capacidade de *S. aureus* produzir enterotoxinas em pão de queijo foi realizado após a contaminação de amostras com *S. aureus* ATCC 13565, produtor de EEA, e incubação a 10 °C e 20 °C por 4, 6, 8 e 24 horas. Após 8 h de incubação todas as amostras incubadas a 20 °C já haviam alcançado a contagem de 10^5 UFC/g. A maior contagem obtida após 24 h de incubação foi de $2,6 \times 10^6$ UFC/g.

As médias das contagens de *S. aureus* produtor de EEA em massa de pão de queijo analisadas foram descritas na Tabela 2. Foi observada interação entre tempo e temperatura de incubação. Em ambas as temperaturas, com o aumento do tempo de incubação houve uma maior geração de unidades formadoras de colônias. Para todos os tempos de incubação, foi observado maior número de unidades formadoras de colônias a 20 °C. As contagens de *S. aureus* observadas não apresentaram diferença significativa a $p < 0,05$ entre as médias calculadas quando incubadas a 10 °C por 4, 6 e 8 horas, indicando diferença significativa a 24 horas. As contagens de *S. aureus* observadas não apresentaram diferença significativa a $p < 0,05$ entre as médias calculadas quando incubadas a 20 °C por 4 e 6 horas, indicando diferença significativa a 8 e 24 horas. As contagens de *S. aureus* observadas não apresentaram diferença significativa a $p < 0,05$ entre as temperaturas de incubação nos tempos de 4, 6 e 24 horas, indicando diferença significativa a 8 horas.

Tabela 3. Médias das Contagens de *S. aureus* produtor de EEA em massa de pão de queijo antes do assamento¹

Temperatura de incubação	Tempos de incubação			
	4 horas	6 horas	8 horas	24 horas
	Médias das Contagem em UFC/g			
10 °C	2,2 x 10 ⁴ B a ± 1,0 x 10 ⁴	2,9 x 10 ⁴ B a ± 1,5 x 10 ⁴	9,3 x 10 ⁴ B a ± 3,6 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁶ A a ± 2,2 x 10 ⁵
20 °C	5,3 x 10 ⁴ C a ± 2,4 x 10 ⁴	6,9 x 10 ⁴ C a ± 2,6 x 10 ⁴	2,9 x 10 ⁵ B b ± 1,2 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁶ A a ± 7,1 x 10 ⁵

¹ *S. aureus* não foi isolada de nenhuma das amostras de pão de queijo analisadas após o assamento. Médias assinaladas com letras maiúsculas diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Indicam diferença significativa entre os tempos de incubação. Médias assinaladas com letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Indicam diferença significativa entre as temperaturas de incubação.

A detecção de EEA foi realizada com o ensaio RPLA (Denka Seiken Ltda., Tóquio, Japão) das amostras após os diferentes tempos e temperaturas de incubação. Os resultados obtidos com os ensaios RPLA estão na tabela 4. A detecção de EEA ocorreu após 8 e 24 h de incubação das amostras a 10 °C e 20 °C.

Tabela 4. Resultado da produção de EEA nas massas de pão de queijo contaminadas com *S. aureus* e incubadas a 10 °C ou 20 °C por 4, 6, 8 e 24 horas

Temperaturas / tempos de incubação	Resultados RPLA	
	Antes do assamento	Depois do assamento
10 °C 4 h	-	-
10 °C 6 h	-	-
10 °C 8 h	+	-
10 °C 24 h	+	+
20 °C 4 h	-	-
20 °C 6 h	-	-
20 °C 8 h	+	-
20 °C 24 h	+	+

A multiplicação de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas estafilocócicas são influenciadas pelos fatores intrínsecos da matriz alimentar e pelos fatores extrínsecos os quais o alimento é submetido. Não existe uma relação definida entre a contagem de *S. aureus* e a produção de enterotoxina. Neste trabalho a produção de enterotoxina ocorreu a partir de uma contagem de $4,4 \times 10^4$ UFC de *S. aureus*/g. Resta e Oliveira (2013) e Santana *et al.* (2010) relataram produção de enterotoxina a partir de contagens superiores a 10^5 UFC de *S. aureus*/g. Outros trabalhos na Itália e no Japão também relataram a presença de EEA, EEC e EED em leite e derivados (SAKA; TERZI GULEL, 2018; CARFORA *et al.*, 2015; FUJIKAWA; HIRAYAMA, 2017).

A avaliação da inativação após o processamento térmico do pão de queijo foi realizada com o SET-RPLA das amostras após o assamento a 180 °C por 35 minutos. Esse tratamento térmico foi suficiente para inativar a EEA das amostras contaminadas e incubadas por 8h a 10 °C e 20 °C, porém não foi suficiente para inativar EEA das amostras incubadas por 24h a 10 °C e 20 °C, conforme Tabela 4. A inativação térmica da EEA depende, entre outros fatores, dos níveis iniciais de EEA na matriz alimentar.

Necidová *et al.* (2016) avaliaram a estabilidade térmica de EEA, EEB e EEC produzidas em leite previamente contaminado com 10^4 a 10^5 UFC/g de *S. aureus* enterotoxigênicos e incubado a 37 °C por 24 h. Após tratamentos térmicos a 72, 85 e 92 °C por 15 segundos, todas as amostras foram negativas para *S. aureus*, porém enterotoxinas foram detectadas em 87,5 % (35/40), 52,5 % (21/40) e 45,0 % (18/40) amostras, respectivamente. Houve redução significativa na quantidade de enterotoxinas após os processamentos térmicos e EEB foi detectada em menores quantidades quando comparada com EEA e EEC. Tibana *et al.* (1987) analisaram a estabilidade térmica da EEA, EEB e EEC em um sistema tamponado contendo 100 ng de enterotoxina/mL. Os resultados indicaram que as temperaturas e tempos de cocção utilizados em rotinas domésticas não foram suficientes para a inativação completa das enterotoxinas. A EEC apresentou maior resistência térmica seguida pela EEA e EEB.

Necidová *et al.* (2019), posteriormente, estudaram a estabilidade térmica de EEA, EEB e EEC após autoclavação a 100, 110 e 121 °C por 3 min. de amostras de leite contaminadas com 38 diferentes cepas de *S. aureus* enterotoxigênicos (produtores de EEA, EEB ou EEC) e incubação a 37 °C por 24 horas. A quantidade de enterotoxinas detectadas nas amostras diminuiu após os tratamentos térmicos, porém enterotoxinas foram detectadas em 36,8 % (14/38), 34,2 % (13/38) e 31,6 % (12/38) das amostras após 100 °C; 110 °C e 121 °C, respectivamente. As maiores quantidades de enterotoxinas detectadas e maior frequência de amostras positivas foram naquelas contaminadas com EEA. Quantidades menores de EEB e EEC foram produzidas e foram inativadas a 100 °C. Os autores ressaltaram que a inativação de enterotoxinas estafilocócicas depende da quantidade de enterotoxina presente antes do tratamento térmico e do tipo de enterotoxina. O leite em pó desnatado associado ao surto de intoxicação por EEA, ocorrido no Japão com 13.420 doentes, havia sido processado a 130 °C por 2 a 4 segundos. As células de *S. aureus* foram destruídas, porém a EEA, que possivelmente havia sido produzida durante o armazenamento do leite cru, manteve as suas propriedades biológicas e imunológicas.

A multiplicação de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas estafilocócicas são

influenciadas por diferentes fatores inerentes ao alimento e ao processamento aplicado durante a fabricação. As medidas chaves para a prevenção de intoxicação estafilocócica, portanto, são evitar a contaminação do alimento por *S. aureus* enterotoxigênico e prevenir a sua multiplicação durante toda a produção e processamento.

4. CONCLUSÃO

Nenhuma das cepas de *S. aureus* analisadas apresentava genes para a produção das quatro enterotoxinas clássicas testadas, porém como existem 23 enterotoxinas estafilocócicas identificadas, não é possível descartar a presença de cepas com outros genes responsáveis pela expressão de EEE e das enterotoxinas estafilocócicas não-clássicas. A presença de *S. aureus* em várias amostras acima do tolerado pela legislação brasileira indica, portanto, um potencial risco a saúde dos seus consumidores.

O tratamento térmico de 180 °C por 35 minutos não foi suficiente para inativar EEA das amostras de pão de queijo, que haviam sido artificialmente contaminadas e incubadas por 24h a 10 °C e 20 °C. Portanto, a inativação térmica da EEA dependerá, entre outros fatores, dos níveis iniciais de EEA na massa de pão de queijo.

REFERÊNCIAS

- ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, jul. 2010.
- ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T; SHIBATA, T; ODA, H; HARUKI, K; NAKAZAWA, H; KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology & Infect**, v. 130, n. 1, p. 33-40, feb. 2003.
- BABIC´, M.; PAJIC´, M.; RADINOVIC´, M.; BOBOS´, S.; BULAJIC´, S.; NIKOLIC´, A.; BRANKO, V. Effects of Temperature Abuse on the Growth and Staphylococcal Enterotoxin A Gene (sea) Expression of *Staphylococcus aureus* in Milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 16, n. 4, p. 282-289, 2018.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 12 de 2 de Janeiro de 2001**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b. Acesso em: 14 out. 201.
- BENCARDINO, D.; VITALI, L. A. *Staphylococcus aureus* carriage among food handlers in a pasta company: pattern of virulence and resistance to linezolid. **Food Control**, v. 96, p. 351-356, feb. 2019.
- CARFORA, V.; CAPRIOLI, A.; MARRI, N.; SAGRAFOLI, D.; BOSELLI, C.; GIACINTI, G.; GIANGOLINI, G.; SORBARA, L.; DOTTARELLI, S.; BATTISTI, A.; AMATISTE, S. Short communication: Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy, **International Dairy Journal**, v. 42, p. 12-15, mar. 2015.
- CHAO, G.; BAO, G.; CAO, Y.; YAN, W.; WANG, Y.; ZHANG, X.; ZHOU, L.; WU, Y. Prevalence and diversity of enterotoxin genes with genetic background of *Staphylococcus aureus* isolates from different origins in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 211, p. 142-147, 2015.
- CHENG, J.; WANG, Y.; CAO, Y.; YAN, W.; NIU, X.; ZHOU, L.; CHEN, J.; SUN, Y.; LI, C.; ZHANG, X.; WU, Y. The Distribution of 18 Enterotoxin and Enterotoxin-Like Genes in *Staphylococcus aureus* Strains from Different Sources in East China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n. 4, p. 171-176, 2016.
- CUNHA, M. L. R. S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R. A. O.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 70-74, mar. 2006.
- DO CARMO, L. S.; CUMMINGS, C.; LINARDI, V. R.; DIAS, R. S.; SOUZA, J. M. de; SENA, M. J. de; SANTOS, D. A. dos; SHUPP, J. W.; PEREIRA, R. K. P.; JETT, M. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incidente. **Foodborne Pathogens Disease**, v. 1, n. 4, p. 241-246, 2004.
- DORES, M. T.; DIAS, R. S.; ARCURI, E. F.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus aureus* isolated from Artisan Minas cheese from

the Serra da Canastra - MG, Brazil. **Food Science and Technology** (Campinas), v. 33, n. 2, p. 271-275. abr./jun. 2013.

ERCOLI, L., GALLINA, S., NIA, Y., AUVRAY, F., PRIMAVILLA, S., GUIDI, F., PIERUCCI, B., GRAZIOTTI, C., DECASTELLI, L., SCUOTA, S. Investigation of a Staphylococcal Food Poisoning Outbreak from a Chantilly Cream Dessert, in Umbria (Italy). **Foodborne pathogens and disease**, v. 14, n. 7, p. 407-413, 2017.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) AND THE EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **EFSA Journal**, 2018, v. 16, n. 12, 2018.

FDA. **Bad bug book**: handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. Food and Drug Administration, Washington. 2012. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2018.

FERRARI, R. G.; WINKLER, S. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação microbiológica de alimentos isentos de registro no Ministério da Saúde. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 241-250, abr./jun. 2007.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FUJIKAWA, H.; HIRAYAMA, W. Solid-phase extraction of staphylococcal enterotoxin A in dairy products using an ion exchange resin. **Food Control**, v. 73, Part B, p. 720-725, mar. 2017.

GRANZA, A. G.; HORNING, P. S.; ZIELINSKI, A. A. F.; NOGUEIRA, A.; SCHNITZLER, E.; DEMIATE, I. M. Gluten-free baked foods with extended shelf-life. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, Issue 8, p. 3035-3045, aug. 2018.

GUIDI, F., DURANTI, A., GALLINA, S., NIA, Y., PETRUZZELLI, A., ROMANO, A., TRAVAGLINI, V., OLIVASTRI, A., CALVARESI, V., DECASTELLI, L., BLASI, G. Characterization of a Staphylococcal Food Poisoning Outbreak in a Workplace Canteen during the Post-Earthquake Reconstruction of Central Italy. **Toxins**, v. 10, n. 12, p. 523-534, 2018.

HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012.

IKEDA, T.; TAMATE, N.; YAMAGUCHI, K.; MAKINO, S-I. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of Staphylococcal enterotoxins A and H. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2793-2795, 2005.

JOHLER, S.; GIANNINI, P.; JERMINI, M.; HUMMERJOHANN, J.; BAUMGARTNER, A.; STEPHAN, R. Further Evidence for Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Caused by egc-Encoded Enterotoxins. **Toxins (Basel)**, v. 7, n. 3, p. 997-1004, mar. 2015.

JOHNSON, W. M.; TYLER S. D.; EWAN, E. P.; ASHTON, F. E.; POLLARD, D. R.; ROZEE, K. R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock

syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 426-430, 1991.

JOHNSON, W. M. *et al.* The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 426-430, 1991.

MANSOUR, A. S.; WAGIH, G. E.; MORGAN, S. D.; ELHARIRI, M.; EL-SHABRAWY, M. A.; ABUELNAGA, A.; ELGABRY, E. A. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains in bovine raw milk by reversed passive latex agglutination and multiplex polymerase chain reaction. **Veterinary World**, v. 10, n. 8, p. 843-847, aug. 2017.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 618-623, 1998.

MILES, A. A.; MIRAS, S. S. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v.38, p. 732-748, 1938.

NECIDOVÁ, L.; BOGDANOVICOVA, K.; HARUSTIAKOVA, D.; BARTOVA, K. Short communication: Pasteurization as a means of inactivating staphylococcal enterotoxins A, B, and C in milk. **Journal Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 8638-8643, 2016.

NECIDOVÁ, L.; BURSOVÁ, S.; HARUŠTIAKOVÁ, D.; BOGDANOVIČOVÁ, K.; LAČANIN, I. Effect of heat treatment on activity of staphylococcal enterotoxins of type A, B and C in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 1-9, 2019.

NUNES, R. S. C.; SOUZA, C. P.; PEREIRA, K. S.; DEL AGUILA; E. M.; PASCHOALIN, V. M. F. Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2641-2653, apr. 2016.

OMOE, K.; HU, D-L.; ONO, H. K.; SHIMIZU, S.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; UCHIYAMA, T.; SHINAGAWA, K.; IMANISHIG, K. Emetic Potentials of Newly Identified Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxins. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3627-3631, oct. 2013.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins (Basel)**, v. 2, n. 8, p. 2177-2197, ago. 2010.

RESTA, M. S. A.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Evaluation of the coagulase-positive staphylococci standard required by Brazilian regulations for pasta. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 4, p. 319-325, out./dez., 2013.

SAKA, E.; TERZI GULEL, G. Detection of Enterotoxin Genes and Methicillin-Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from Water Buffalo Milk and Dairy Products. **Journal Food Science**, v. 83, n. 6, p. 1716-1722, jun. 2018.

Seo, K. S.. Monkey feeding assay for testing emetic activity of staphylococcal enterotoxin. **Methods in Molecular Biology**, v. 1396, p. 125 – 131, 2016.

SILVA, J. P. L.; RIBEIRO, A. P. O.; COSTA, S. D. O.; MELLO, V. F.; LINDENBLATT, C. T. *Staphylococcus spp.*: incidências e surtos. Brasília: Embrapa, 2015.

SILVA, E. K.; HIJO, A. A. C. T.; COSTA, J. M. G.; MARQUES, G. R.; PEREIRA, J.; BORGES, S. V. Influence of the addition of microencapsulated Swiss cheese bioaroma on the technical and sensory qualities of cheese bread. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, n. 3, p. 372-379, aug. 2017.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017.

SOUZA, C. S. M.; FORTALEZA, C. M. C. B.; WITZEL, C. L.; SILVEIRA, M.; BONESSO, M. F.; MARQUES, S. A.; CUNHA, M. L. R. S. Toxigenic profile of methicillin-sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* isolated from special groups. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 9, p. 1-5, 2016.

TIBANA, A.; RAYMAN, K.; AKHTAR, M.; SZABO, R. Thermal stability of enterotoxins A, B and C in a buffered system. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 3, p. 239-242, mar. 1987.

UMEDA, K.; NAKAMURA, H.; YAMAMOTO, K.; NISHINA, N.; YASUFUKU, K.; HIRAI, Y.; HIRAYAMA, T.; GOTO, K.; HASE, A.; OGASAWARA, J. Molecular and epidemiological characterization of staphylococcal foodborne outbreak of *Staphylococcus aureus* harboring seg, sei, sem, sen, seo, and selu genes without production of classical enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 256, n. 1, p. 30-35, sep. 2017.

ZAPATA, F.; ZAPATA, E.; RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E. Influence of guar gum on the baking quality of gluten-free cheese bread made using frozen and chilled dough. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, p. 313–324, 2019.

6 CONCLUSÃO

Nenhuma das cepas de *S. aureus* analisadas apresentava genes para a produção das quatro enterotoxinas clássicas testadas, porém como existem 23 enterotoxinas estafilocócicas identificadas, não é possível descartar a presença de cepas com outros genes responsáveis pela expressão de EEE e das enterotoxinas estafilocócicas não-clássicas. A presença de *S. aureus* em várias amostras acima do tolerado pela legislação brasileira indica, portanto, um potencial risco a saúde dos seus consumidores.

O tratamento térmico de 180 °C por 35 minutos não foi suficiente para inativar EEA das amostras de pão de queijo, que haviam sido artificialmente contaminadas e incubadas por 24h a 10 °C e 20 °C. Portanto, a inativação térmica da EEA dependerá, entre outros fatores, dos níveis iniciais de EEA na massa de pão de queijo.

REFERÊNCIAS

- ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, jul. 2010.
- ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T; SHIBATA, T; ODA, H; HARUKI, K; NAKAZAWA, H; KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology & Infect**, v. 130, n. 1, p. 33-40, feb. 2003.
- BABIC´, M.; PAJIC´, M.; RADINOVIC´, M.; BOBOS´, S.; BULAJIC´, S.; NIKOLIC´, A.; BRANKO, V. Effects of Temperature Abuse on the Growth and Staphylococcal Enterotoxin A Gene (sea) Expression of *Staphylococcus aureus* in Milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 16, n. 4, p. 282-289, 2018.
- BENNETT, R. W. Staphylococcal, enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 6, p. 1264-1270, 2005.
- BENNETT, R. W.; MC CLURE, F. Visual screening with enzyme immunoassay for staphylococcal enterotoxins in foods: collaborative study. **Journal AOAC International**, v.77, p.357-364, 1994.
- BERGDOLL, M. S. Detection of the staphylococcal toxins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 391, p. 465-479, 1996.
- BERGDOLL, M. S.; SURGALLA, M. J.; DACK, G. M. Staphylococcal enterotoxin: identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. **Journal of Immunology**, v. 83, n. 3, p. 334-338, set. 1959.
- BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C.; KUAYE, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p.1431-1438, 2008.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12 de 2 de Janeiro de 2001. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b. Acesso em: 14 out. 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. 2017. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>. Acesso em: 19 jan. 2019.
- BENCARDINO, D.; VITALI, L. A. *Staphylococcus aureus* carriage among food handlers in a pasta company: pattern of virulence and resistance to linezolid. **Food Control**, v. 96, p. 351-356, feb. 2019.
- CARFORA, V.; CAPRIOLI, A.; MARRI, N.; SAGRAFOLI, D.; BOSELLI, C.; GIACINTI, G.; GIANGOLINI, G.; SORBARA, L.; DOTTARELLI, S.; BATTISTI, A.; AMATISTE, S. Short communication: Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin

resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy, **International Dairy Journal**, v. 42, p. 12-15, mar. 2015.

CDC. Centro de Prevenção e Controle de Doenças. Vigilância de surtos de doenças transmitidas por alimentos Estados Unidos, 2016: Relatório. Disponível em: https://www.cdc.gov/fdoss/pdf/2016_FoodBorneOutbreaks_508.pdf. Acesso em: 28 jan. 2019.

CHAO, G.; BAO, G.; CAO, Y.; YAN, W.; WANG, Y.; ZHANG, X.; ZHOU, L.; WU, Y. Prevalence and diversity of enterotoxin genes with genetic background of *Staphylococcus aureus* isolates from different origins in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 211, p. 142-147, 2015.

CHENG, J.; WANG, Y.; CAO, Y.; YAN, W.; NIU, X.; ZHOU, L.; CHEN, J.; SUN, Y.; LI, C.; ZHANG, X.; WU, Y. The Distribution of 18 Enterotoxin and Enterotoxin-Like Genes in *Staphylococcus aureus* Strains from Different Sources in East China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n. 4, p. 171-176, 2016.

CINTRA, A. P. R.; ANDRADE, M. C. G.; LAZANI, M. M.; ASSIS, D. C. S.; SILVA, G. R.; MENEZES, L. D. M.; ORNELLAS, C. B. D.; FIGUEIREDO, T. C.; CANÇADO, S. V. Influence of cutting room temperature on the microbiological quality of chicken breast meat. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 68, n. 3, p. 814-820, 2016.

CORADO, A.; BAIOSCHI, M.; DA SILVA, E. P.; CALIARI, M.; DAMIANI, C. Physical and chemical characteristics of cheese bread, using fermented broken rice. **Food Science and Technology**, v. 37, Suppl. 1, p. 142-147, dec. 2017.

CUNHA, M. L. R. S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R. A. O.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 37, n. 1, p.70-74, mar. 2006.

DENAYER, S.; DELBRASSINNE, L.; NIA, Y.; BOTTELDOORN, A. Food-Borne Outbreak Investigation and Molecular Typing: High Diversity of *Staphylococcus aureus* Strains and Importance of Toxin Detection. **Toxins** v. 9, n. 12, p. 407-420, dec. 2017.

DEVRIESE, L.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 55, n. 4, p.1569-1573, 2005.

DO CARMO, L. S.; CUMMINGS, C.; LINARDI, V. R.; DIAS, R. S.; SOUZA, J. M. de; SENA, M. J. de; SANTOS, D. A. dos; SHUPP, J. W.; PEREIRA, R. K. P.; JETT, M. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incidente. **Foodborne Pathogens Disease**, v. 1, n. 4, p. 241-246, 2004.

DORES, M. T.; DIAS, R. S.; ARCURI, E. F.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus aureus* isolated from Artisan Minas cheese from the Serra da Canastra - MG, Brazil. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 33, n. 2, p. 271-275. abr./jun. 2013.

ELABRAS FILHO, J.; MELLO, F. C. Q.; LUPI, O.; BICA, B. E. R. G.; PAPI, J. A. S.; FRANÇA, A. T. Anticorpos IgE específicos para superantígenos estafilocócicos: grau de sensibilização e associação com a gravidade da asma. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 42, n. 5, p. 356-361, set./out. 2016.

ELAHI, S.; FUJIKAWA, H. Comprehensive Study of the Boundaries of Enterotoxin A Production and Growth of *Staphylococcus aureus* at Various Temperatures and Salt Concentrations. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 1, p. 121-126, 2019.

ERCOLI, L., GALLINA, S., NIA, Y., AUVRAY, F., PRIMAVILLA, S., GUIDI, F., PIERUCCI, B., GRAZIOTTI, C., DECASTELLI, L., SCUOTA, S. Investigation of a Staphylococcal Food Poisoning Outbreak from a Chantilly Cream Dessert, in Umbria (Italy). **Foodborne pathogens and disease**, v.14, n. 7, p. 407-413, 2017.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) AND THE EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **EFSA Journal**, 2018, v.16, n. 12, p. 251, 2018.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus***. 2018. Disponível em: <http://www.bacterio.net/s/staphylococcus.html>. Acesso em: 15 mar. 2018.

EVENSON, M. L.; HINDS M. W.; BERNSTEIN R. S.; BERGDOLL, M. S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin a from a larger outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal Food Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 311-316, 1988.

FDA. **Bad bug book: handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins**. Food and Drug Administration, Washington. 2012. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2018.

FETSCH, A.; JOHLE, S. *Staphylococcus aureus* as a foodborne pathogen. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 5, n. 2, p. 88-96, jun. 2018.

FERRARI, R. G.; WINKLER, S. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação microbiológica de alimentos isentos de registro no Ministério da Saúde. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 241-250, abr./jun. 2007.

FETSCH, A. ***Staphylococcus aureus***. London: Academic Press, 2017.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FRENEY, J.; KLOOS, W. E.; HAJEK, V.; WEBSTER, J. A.; BES, M.; BRUN, Y.; VERNOSY-ROZAND, C. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p.

489-502, 1999.

FUJIKAWA, H.; HIRAYAMA, W. Solid-phase extraction of staphylococcal enterotoxin A in dairy products using an ion exchange resin. **Food Control**, v. 73, Part B, p. 720-725, mar. 2017.

GORMAZ, J. P.; GAJARDO, P.; ESCOBAR, A.; OLAVARRÍA, C.; SCHÖNFFELDT, P.; SARIEGO, H.; CATALÁN, D.; AGUILLÓN, J. C. Perfil de producción de citoquinas en linfocitos T de sangre periférica de pacientes con poliposis nasal y asma bronquial em respuesta a la estimulación con enterotoxina estafilocócica B. **Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello**, v. 70, n. 3, p. 195-204, dez. 2010.

GRANZA, A. G.; HORNUNG, P. S.; ZIELINSKI, A. A. F.; NOGUEIRA, A.; SCHNITZLER, E.; DEMIATE, I. M. Gluten-free baked foods with extended shelf-life. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, Issue 8, p. 3035-3045, aug. 2018.

GUIDI, F., DURANTI, A., GALLINA, S., NIA, Y., PETRUZZELLI, A., ROMANO, A., TRAVAGLINI, V., OLIVASTRI, A., CALVARESI, V., DECASTELLI, L., BLASI, G. Characterization of A Staphylococcal Food Poisoning Outbreak in A Workplace Canteen during the Post-Earthquake Reconstruction of Central Italy. **Toxins**, v.10, n.12, p. 523-534, 2018.

HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. Federation of European Microbiological Societies. **Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012.

IKEDA, T.; TAMATE, N.; YAMAGUCHI, K.; MAKINO, S-I. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of Staphylococcal enterotoxins A and H. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2793-2795, 2005.

JAY, J. M. **Microbiología de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JOHNSON, W. M.; TYLER, S. D.; EWAN, E. P.; ASHTON, F. E.; POLLARD, D. R.; ROZEE, K. R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 426-430, 1991.

JOHNSON, W. M. *et al.* The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 426-430, 1991.

JOHLER, S.; GIANNINI, P.; JERMINI, M.; HUMMERJOHANN, J.; BAUMGARTNER, A.; STEPHAN, R. Further Evidence for Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Caused by egc-Encoded Enterotoxins. **Toxins (Basel)**, v. 7, n.3, p. 99-1004, mar. 2015.

LANCETTE, G. A.; TATINI, S. R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDRZANT, C. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 1992.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RÅDSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.

MANSOUR, A. S.; WAGIH, G. E.; MORGAN, S. D.; ELHARIRI, M.; EL-SHABRAWY, M. A.; ABUELNAGA, A.; ELGABRY, E. A. (2017). Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains in bovine raw milk by reversed passive latex agglutination and multiplex polymerase chain reaction. **Veterinary World**, v.10, n.8, p. 843-847, aug. 2017.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 618-623, 1998.

MILES, A. A.; MIRAS, S. S. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, p. 732-748, 1938.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLERR, M. A. **Microbiologia médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NECIDOVÁ, L.; BOGDANOVICOVA, K.; HARUSTIAKOVA, D.; BARTOVA, K. Short communication: Pasteurization as a means of inactivating staphylococcal enterotoxins A, B, and C in milk. **Journal Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 8638-8643, 2016.

NECIDOVÁ, L.; BURSOVÁ, S.; HARUŠTIAKOVÁ, D.; BOGDANOVIČOVÁ, K.; LAČANIN, I. Effect of heat treatment on activity of staphylococcal enterotoxins of type A, B and C in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 1-9, 2019.

NOGUEIRA, C. **Pão de queijo mineiro**. 2018. Disponível em: <http://www.charutos ebebidas.com.br/materias/pao-queijo.html>. Acesso em: 13 abr. 2018.

NUNES, R. S. C.; SOUZA, C. P.; PEREIRA, K. S.; DEL AGUILA; E. M.; PASCHOALIN, V. M. F. Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2641-2653, apr. 2016.

ODA, T. Application of SP-Sephadex chromatography to the purification of staphylococcal enterotoxins A, B, and C2. **Japanese Journal of Bacteriology**, v. 33, p. 743-752, 1978.

OLIVEIRA, M. C de S.; REGITANO, L. C. de A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCINIO, E. do; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMOTEO, W. H. B.; BELICUAS, S. N. J. **Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

OMOE, K.; HU, D.-L.; ONO, H. K.; SHIMIZU, S.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; UCHIYAMA, T.; SHINAGAWA, K.; IMANISHIG, K. Emetic Potentials of Newly Identified Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxins. **Infection and Immunity**, v. 81, n.

10, p. 3627-3631, oct. 2013.

OXOID. **SET-RPLA Kit Toxin Detection Kit**. 2019. Disponível em: http://www.oxid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=TD0900&org. Acesso em: 28 fev. 2019.

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

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins (Basel)**, v. 2, n. 8, p. 2177-2197, ago. 2010.

PORTO, E. **Apostila de epidemiologia e toxicologia de alimentos**. 2017. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/288094/mod_resource/content/1/aula%2005.03%20-%20Descr%C3%A7%C3%A3o%20de%20surto.pdf. Acesso em: 05 abr. 2018.

RAMESH, A.; PADMAPRIYA, B. P.; CHRASHEKAR, A.; VARADARAJ, M. C. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 16, n. 4, p. 307-314, ago. 2002.

RESTA, M. S. A.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Evaluation of the coagulase-positive staphylococci standard required by Brazilian regulations for pasta. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 4, p. 319 - 325, out./dez., 2013.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n. 1-2, p. 61-70, 2002.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G.T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM N. Enzymatic application of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SAKA, E.; TERZI GULEL, G. Detection of Enterotoxin Genes and Methicillin-Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from Water Buffalo Milk and Dairy Products. **Journal Food Science**, v. 83, n. 6, p. 1716-1722, jun. 2018.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 545-554, jul./set. 2010.

SANTOS, A. **Estudo comparativo entre a PCR e técnicas imunológicas (ELISA, RPLA e OSP) na enterotoxigenicidade de isolados de estafilococos coagulase negativa**. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method

for species identification of coagulase-positive *staphylococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n.3, p. 765-769, 2010.

SCHELIN, J.; SUSILO, Y. B.; JOHLER, S. Expression of Review: Staphylococcal Enterotoxins under Stress Encountered during Food Production and Preservation. **Toxins (Basel)**, v. 9, n. 12, p. 401-410, 2017.

SCHIMITZ, F. J.; STEIERTT, M.; HOFMANN, B.; VERHOEF, J.; HADDING, U.; HEINZ, H. P.; KOHRER, K. Development of a multiplex-PCR for direct detection of the genes for enterotoxin B and C and toxic shock syndrome toxin1 in *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p. 335-340, 1998.

Seo, K. S.. Monkey feeding assay for testing emetic activity of staphylococcal enterotoxin. **Methods in Molecular Biology**, v. 1396, p. 125 – 131, 2016.

SHINGAKI, M.; IGARASHI, H.; FUJIKAWA, H.; USHIODA, H.; TERAYAMA, T.; SAKAI, S. Study on reversed passive latex agglutination for the detection of staphylococcal enterotoxins A-C. **Annual Report of Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health**. v. 32, 1981.

SHIJIA, W.; DUAN, N.; GU, H.; HAO, L.; YE, H.; GONG, W.; WANG, Z. A Review of the methods for detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 7, p. 176-196, 2016.

SILVA, J. P. L.; RIBEIRO, A. P. O.; COSTA, S. D. O.; MELLO, V. F.; LINDENBLATT, C. T. ***Staphylococcus spp.*: incidências e surtos**. Brasília: EMBRAPA, 2015.

SILVA, E. K.; HIJO, A. A. C. T.; COSTA, J. M. G.; MARQUES, G. R.; PEREIRA, J.; BORGES, S. V. Influence of the addition of microencapsulated Swiss cheese bioaroma on the technical and sensory qualities of cheese bread. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, n. 3, p. 372-379, aug. 2017.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017.

SOUZA, C. S. M.; FORTALEZA, C. M. C. B.; WITZEL, C. L.; SILVEIRA, M.; BONESSO, M. F.; MARQUES, S. A.; CUNHA, M. L. R. S. Toxigenic profile of methicillin-sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* isolated from special groups. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 9, p. 1-5, 2016.

TAM, K.; TORRES, V. P. *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, p. , 2019.

TAPONEN, S.; SUPRÉ, K.; PIESSENS V.; VAN COILLIE, E.; DE VliegHER, S.; KOORT, J. M. *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase variable species

from bovine subclinical and mild clinical mastites. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 62, p. 61-65, 2012.

TEWARE, G.; JUNEJA, V. K. **Advances in thermal and non-thermal in foods preservation**. Ames: Blackwell, 2007.

TIBANA, A.; RAYMAN, K.; AKHTAR, M.; SZABO, R. Thermal stability of enterotoxins A, B and C in a buffered system. **Journal of Food Protection**, v. 50, n.3, p. 239-242, mar. 1987.

UMEDA, K.; NAKAMURA, H.; YAMAMOTO, K.; NISHINA, N.; YASUFUKU, K.; HIRAI, Y.; HIRAYAMA, T.; GOTO, K.; HASE, A.; OGASAWARA, J. Molecular and epidemiological characterization of staphylococcal foodborne outbreak of *Staphylococcus aureus* harboring seg, sei, sem, sen, seo, and selu genes without production of classical enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 256, n.1, p. 30-35, sep. 2017.

VASCONCELOS, N. G.; PEREIRA, V. C.; JÚNIOR, J. P. A.; CUNHA, M. L. R. S. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. **Journal Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 749-762, set. 2011.

VITALE, M.; GAGLIO, S.; GALLUZZO, P.; CASCONI, G.; PIRAINO, C.; DI MARCO, L. P. V.; ALDUINA, R. Antibiotic Resistance Profiling, Analysis of Virulence Aspects and Molecular Genotyping of *Staphylococcus aureus* Isolated in Sicily, Italy. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 3, p.177-185, mar. 2018.

WALLS, R. M.; HOCKBERGER, R.; GAUSCHE-HILL, M. **Rosen's Emergency Medicine: concepts and clinical practice**. 9. ed. Philadelphia: Elsevier, 2017.

WU, S.; DUAN, N.; GU, H.; HAO, L.; YE, H.; GONG, W.; WANG, Z. A Review of the Methods for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v. 8, n. 7, p.176-196, jun. 2016.

ZAPATA, F.; ZAPATA, E.; RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E. Influence of guar gum on the baking quality of gluten-free cheese bread made using frozen and chilled dough. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, p. 313-324, 2019.