



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos - CCQA

JOSIANE COSTA DE LIMA SANTOS

OCORRÊNCIA DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS EM
ALIMENTOS

CAMPINAS
2023

JOSIANE COSTA DE LIMA SANTOS

**OCORRÊNCIA DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS EM
ALIMENTOS**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.*

Aluna: Josiane Costa de Lima Santos

Orientadora: Beatriz Thie Iamanaka

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna
Josiane Costa de Lima Santos e orientada pelo Profa. Dra. Beatriz Thie Iamanaka.

CAMPINAS

2023

Agência(s): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)

Nº do proc.: 88887.483668/2020-00

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Bibliotecária Lucilene Paulina da Silva CRB/8 - 8507
Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL

S237o Santos, Josiane Costa de Lima

Ocorrência de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos / Josiane Costa de Lima Santos. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: Ital, 2023.

65 f.

Orientadora: Dra. Beatriz Thie Iamanaka

1. enterotoxina estafilocócica. 2. Vidas® SET2. 3. *S. aureus*. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital). Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA). II. Santos, Josiane Costa de Lima. III. Título.

Título em inglês: Occurrence of staphylococcal enterotoxins in food.

Key-words: staphylococcal enterotoxins; Vidas® SET2; *S. aureus*

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Valéria C. A. Junqueira (titular), Patrícia B. Z. R. de Sá (titular), Marta H. Taniwaki (suplente), Beatriz T. Iamanaka (orientador)

Data da Defesa: 26 de junho de 2023

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Josiane Costa de Lima Santos, aprovada pela Comissão Julgadora em 26/06/2023.

Profa. Dra. Beatriz Thie Iamanaka
Instituto de Tecnologia de Alimentos (Presidente)

Dra. Valéria C. A. Junqueira
Instituto de Tecnologia de Alimentos (titular)

Dra. Patrícia B.Z. R. de Sá
Instituto de Tecnologia de Alimentos (titular)

Dra. Marta H. Taniwaki
Instituto de Tecnologia de Alimentos (suplente)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que de forma direta ou indireta apoiaram, incentivaram e motivaram a realização do mesmo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por mais esta fase em minha vida, pela sabedoria concedida, pelas experiências vividas, por sua direção em todo tempo.

Agradeço à minha orientadora Beatriz, por ter acreditado em mim, seu apoio, incentivo, paciência e orientações para realização deste trabalho, são marcas gravadas em minha história, que levarei sempre com muito carinho e gratidão.

Agradeço aos meus familiares, por sempre me apoiarem, mesmo sem entenderem o que de fato estava pesquisando e estudando, suas palavras de ânimo, força e tempo dedicado foram alavancas que me motivaram na realização deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos, os que já trazia no peito e aqueles novos que formei aqui, pela ajuda, encorajamento, pelos momentos de vida compartilhados, pelas risadas, por estarem presentes.

Agradeço a equipe do ITAL, especialmente ao laboratório de Microbiologia do CCQA, pelo aprendizado, pela amizade formada, pelo tempo que passamos juntos.

Agradeço aos professores do curso por todo conhecimento compartilhado, pelo tempo dedicado, por me proporcionarem crescimento intelectual e profissional.

Agradeço à empresa Biomerieux por disponibilizar o equipamento Mini VIDAS®, viabilizando a realização deste estudo.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro com a bolsa de estudos.

RESUMO

Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) oferecem risco potencial à saúde do consumidor e causam perdas econômicas ao país, tornando-se uma preocupação em relação a saúde pública. De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificações – SINAN, no Brasil em média por ano são notificados 700 surtos de DTA e o *Staphylococcus aureus* está entre os três agentes etiológicos mais relevantes. Conforme a legislação que dispõe os parâmetros microbiológicos para alimentos (RDC 724/22 e IN 161/22), além das análises de Estafilococos coagulase positiva, passou-se a exigir a análise de enterotoxina estafilocócica em três categorias de alimentos (leites e derivados, suplementos de base láctea e alimentos prontos para o consumo), sendo estes os que apresentam maior risco para a presença desta toxina. Este trabalho teve como objetivo avaliar amostras de alimentos das categorias leites e derivados, e suplementos de base láctea, quanto à presença de enterotoxinas estafilocócicas, contagem de cepas de Estafilococos coagulase positiva e avaliação da atividade de água. As 80 amostras foram coletadas no mercado varejista da cidade de Campinas e analisadas no Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, utilizando kit de detecção Vidas® SET2 da Biomerieux. Constatou-se que 8,75% das amostras apresentaram contagem de Estafilococos coagulase positiva, variando de 1×10^2 a $6,6 \times 10^7$ UFC/g e 2,5% das amostras analisadas apresentarem resultado positivo para a presença de enterotoxina estafilocócica. Uma amostra de queijo minas artesanal com contagem de 1×10^2 UFC/g, valor este dentro do limite aceitável para Estafilococos coagulase positiva, apresentou resultado positivo para enterotoxina. Uma amostra de produto lácteo fundido onde não foi detectada a presença de Estafilococos coagulase positiva, também apresentou resultado positivo para enterotoxina estafilocócica. Ambas as amostras se apresentaram dentro da faixa de atividade de água (0,939 e 0,992 respectivamente) ótima para a produção de enterotoxina. A incidência de enterotoxinas em alimentos destinados ao consumidor final, embora em baixa porcentagem, indica que o risco de contaminação existe e faz-se necessário o controle desta toxina nestas categorias de alimentos.

Palavras-chave: enterotoxina estafilocócica; Vidas® SET2; *S. aureus*.

ABSTRACT

Foodborne Diseases (FADs) pose a potential risk to consumer health and cause economic losses to the country, becoming a public health concern. According to the Notifiable Diseases Information System – SINAN, on average 700 DTA outbreaks are reported in Brazil per year and *Staphylococcus aureus* is among the three most relevant etiological agents. According to the legislation that provides microbiological parameters for foods (RDC 724/22 and IN 161/22), in addition to the analysis of coagulase-positive Staphylococci, the analysis of staphylococcal enterotoxin in three categories of food (milk and dairy products, dairy-based supplements and ready-to-eat foods), these being the ones that present the greatest risk for the presence of this toxin. This work aimed to evaluate food samples from the milk and dairy products categories, and dairy-based supplements, for the presence of staphylococcal enterotoxins, count of coagulase-positive Staphylococci strains and assessment of water activity. The 80 samples were collected at the retail market in the city of Campinas and analyzed at the Institute of Food Technology – ITAL, using Biomerieux's Vidas® SET2 detection kit. It was found that 8.75% of the samples showed a positive coagulase Staphylococcus count, ranging from 1×10^2 to $6,6 \times 10^7$ CFU/g and 2,5% of the analyzed samples showed a positive result for the presence of staphylococcal enterotoxin. A sample of artisanal Minas cheese with a count of 1×10^2 CFU/g, a value within the acceptable limit for coagulase-positive Staphylococci, showed a positive result for enterotoxin. A sample of melted dairy product where the presence of coagulase-positive Staphylococci was not detected also tested positive for staphylococcal enterotoxin. Both samples were within the water activity range (0,939 and 0,992 respectively) optimal for the production of enterotoxin. The incidence of enterotoxins in foods destined for the final consumer, although at a low percentage, indicates that the risk of contamination exists and it is necessary to control this toxin in these food categories.

Key words: staphylococcal enterotoxin; Vidas® SET2; *S. aureus*.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
SUMÁRIO.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
Objetivos principais	3
Objetivo específico	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 <i>Staphylococcus</i>	4
3.2 Importância do <i>Staphylococcus aureus</i> e as enterotoxinas.....	5
3.3 Ocorrência em alimentos.....	8
3.4 Métodos de análises	12
3.5 Legislação	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Amostras	15
4.2. Contagem de Estafilococos coagulase positiva	16
4.3 Análise de enterotoxinas estafilocócicas – extração	17
4.3.1 Produtos lácteos líquidos	17
4.3.2 Produtos lácteos	18
4.3.3 Alimentos lácteos desidratados	18
4.3.4 Suplementos de base láctea:.....	18
4.4 Análise de enterotoxinas estafilocócicas – equipamento MiniVidas®	19
4.5 Testes preliminares realizados com cepas de <i>S. aureus</i>	20

4.6 Testes preliminares realizados com a enterotoxina estafilocócica para avaliar a performance do kit Vidas SET 2	21
4.7 Avaliação da Atividade de Água.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1 Contagem de Estafilococos coagulase positiva	23
5.2 Detecção de enterotoxina estafilocócica	29
5.3 Valores de atividade de água.....	31
5.4 Análise com cepa produtora de enterotoxina	35
5.5 Desempenho do kit de detecção – enterotoxina purificada.....	36
5.6 Tabela comparativa dos resultados obtidos nas análises	37
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

ATCC – American Type Culture Collection

Aw – Atividade de água

BPM – Batida por minuto

CCQA – Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos

CCT – Coleção de Culturas Tropical

DTA – Doença Transmitida por Alimentos

ELFA – Ensaio fluorescente ligado a enzima

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

IN – Instrução Normativa

ISO – International Organization for Standardization

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PPB – Parte por milhão

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

SE – Enterotoxina Estafilocócica

SEA – Enterotoxina Estafilocócica A

SEB – Enterotoxina Estafilocócica B

SEC – Enterotoxina Estafilocócica C

SED – Enterotoxina Estafilocócica D

SEE – Enterotoxina Estafilocócica E

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificações

UFC – Unidade formadora de colônia

VT – Valor de Teste

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Equipamento MiniVidas® Biomeriuex	19
Figura 2 – Kit Vidas® SET2, barrete e cone	20
Figura 3 – Equipamento analisador de Aw – AquaLab	22
Figura 4 – Representação gráfica comparativa de Estafilococos coagulase positiva: detecção em amostras de queijo x limite legislação	27
Figura 5 – Representação gráfica comparativa para limite de detecção enterotoxina estafilocócica com valores (VT) obtidos em análise, método Vidas® SET2	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Contagem de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva para as amostras categoria: queijos	23
Tabela 2 – Contagem de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva para as amostras categoria: produtos lácteos processados fundidos, incluindo requeijão e misturas lácteas pastosas	24
Tabela 3 – Contagem de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva para as amostras categoria: produtos lácteos em pó, incluindo leite, compostos lácteos, soro de leite e concentrados proteicos de leite ou de soro	25
Tabela 4 – Contagem de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva para as amostras categoria: doce de leite, leite condensado e doce de base láctea, não comercialmente estéreis.	25
Tabela 5 – Contagem de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva para as amostras categoria: mistura em pó para o preparo de bebida de base láctea	26
Tabela 6 – Contagem de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva para as amostras categoria: suplemento proteico em pó e em barra	26
Tabela 7 – Categoria de alimentos e detecção de enterotoxinas	29
Tabela 8 – Resultado para análise de atividade de água (A_w)	31
Tabela 9 – Resultados para análise de contagem de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva, atividade de água (A_w) e detecção de enterotoxina estafilocócica	37

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) é uma grande preocupação em relação à saúde pública e estas são responsáveis por diversas mortes no mundo, além de causar grandes prejuízos econômicos ao país devido à necessidade de hospitalização dos doentes. De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan (BRASIL, 2020) em média por ano no Brasil são notificados 700 surtos de DTA, abrangendo 13 mil doentes e 10 óbitos. Mas é esperado que estes números sejam maiores devido à subnotificação que ocorre no país.

A intoxicação alimentar é uma forma de DTA ocasionada pela ingestão de alimentos que contenham substâncias tóxicas, inclusive as toxinas produzidas por microrganismos.

Entre os agentes etiológicos mais identificados nos surtos de DTA no Brasil, uma pesquisa realizada nos anos de 2000 a 2017, apontou o *Staphylococcus aureus* como o terceiro colocado, sendo responsável por 18,2% dos surtos registrados (BRASIL, 2018). Entre o período de 2012 a 2021, *S. aureus* passou a ocupar a segunda posição dentre os agentes mais identificados nos surtos (BRASIL, 2022).

As enterotoxinas estafilocócicas são produzidas por espécies de *Staphylococcus*, principalmente a subespécie *S. aureus*. Este microrganismo está presente nas vias nasais, garganta, pele e cabelo dos seres humanos, desta forma a contaminação pode ocorrer através da tosse e espirros, infecções das mãos dos manipuladores dos alimentos, consequente da falta de higiene e de boas práticas.

Alimentos contaminados com enterotoxinas estafilocócicas são frequentemente relacionados as doenças transmitidas por alimentos. Com a capacidade de se desenvolver em uma ampla faixa de pH e temperatura, a contaminação em diversos tipos de alimentos pode ocorrer durante o preparo e manuseio através de indivíduos portadores de *S. aureus* e quando ocorre falhas na pasteurização ou refrigeração inadequada, o que proporciona rápido crescimento deste microrganismo e produção de sua enterotoxina, da qual a dose inferior a 1 µg já pode ocasionar intoxicação alimentar (PINCHUK, BESWICK e REYES, 2010).

Outra forma de contaminação ocorre através da mastite bovina, sendo essa uma infecção da glândula mamária, manifestada de forma clínica ou subclínica, ocasionando alterações microbiológicas no leite (CORTEZI, 2014).

Após consulta pública e reuniões com diversos segmentos importantes da cadeia produtiva de alimentos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 331 de 23 de dezembro de 2019 e a Instrução Normativa (IN) nº 60 de 23 de dezembro de 2019, que estabelecia os padrões microbiológicos para alimentos prontos para consumo. Esta Resolução entrou em vigor a partir de 23 de dezembro de 2020 substituindo a RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Dentre as principais alterações, destacou-se a necessidade do monitoramento de toxinas, como as enterotoxinas estafilocócicas para algumas categorias específicas de alimentos. Em 2022 foi realizada nova atualização e publicada a RDC nº 724 de 1º de julho de 2022 e a IN nº 161 de 1º de julho de 2022, que entraram em vigor a partir de 1º de setembro de 2022. Na legislação em vigor a análise de enterotoxinas é solicitada em três categorias de alimentos: leite e derivados, suplementos alimentares em pó e barra de base láctea e alimentos prontos para o consumo. O limite de detecção do método utilizado deve ser menor ou igual a 1ng/g, para plano de duas classes e amostragem representativa (n=5, c=0).

A realização de análises microbiológicas é indispensável pois estas fornecem dados importantes sobre a qualidade do alimento e sua estabilidade, indicando se foram produzidos dentro dos padrões de qualidade (ICMSF, 2018).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de alimentos das categorias leites e derivados e suplementos alimentares (de base láctea), vendidos no varejo, em relação à contaminação por *Estafilococos* coagulase positiva e por enterotoxinas estafilocócicas, utilizando a técnica imunoensaio baseado no método ELFA (teste fluorescente ligado a enzima).

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS PRINCIPAIS

- Avaliar a contaminação por *Estafilococos* coagulase positiva em alimentos das categorias: leites e derivados e suplementos alimentares de base láctea.
- Avaliar a presença de enterotoxina estafilocócica nestes alimentos.
- Avaliar a Atividade de Água das amostras analisadas, para comparar com a faixa ideal de crescimento de *Staphylococcus aureus* e produção da enterotoxina estafilocócica.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar o desempenho do kit de detecção de enterotoxina por imunoensaio baseado no método ELFA (teste fluorescente ligado a enzima), utilizando amostras artificialmente contaminadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 STAPHYLOCOCCUS

O gênero *Staphylococcus* pertencente à família *Staphylococcaceae*, e abrange mais de 70 espécies e subespécies caracterizadas até o momento (PARTE *et al.*, 2020). De acordo com a sua capacidade de produzir ou não a enzima coagulase, é dividido em dois grupos: Estafilococos coagulase positiva e Estafilococos coagulase negativa.

Este gênero é formado por bactérias gram-positivas, na forma de cocos que agrupados são similares a cachos de uva. São células imóveis, anaeróbias facultativas, não esporogênicas, com teste geralmente positivos para catalase e negativo para oxidase.

Os estafilococos são bactérias comensais que colonizam cerca de um terço da população e nesta condição são inofensivos, podendo causar algum mal se tiverem acesso ao sangue por meio de algum corte (Gillaspy e Landolo, 2009).

Baseando-se em testes de coagulase e a resistência aos antibióticos, as espécies de *Staphylococcus* foram divididas em grupos. No grupo *S. aureus* o qual apresenta o teste de coagulase positiva e susceptibilidade à novobiocina, está inserido o *S. aureus* subespécie *aureus*, sendo este o mais importante grupo em relação aos casos de doenças transmitidas por alimentos e produção de enterotoxinas. Este microrganismo é normalmente denominado na literatura apenas como *S. aureus*, sem fazer referência a subespécie. De acordo com a International Commission on Microbiological Specifications for Foods, a bactéria *S. aureus* entra na classificação de grupo de risco I que inclui as doenças de “perigo moderado e usualmente de curta duração sem ameaça de morte ou sequelas, com sintomas auto limitados, mas que causam severo desconforto” (ICMSF, 2018).

3.2 IMPORTÂNCIA DO *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E AS ENTEROTOXINAS

O *S. aureus* é uma bactéria na forma de cocos, mesófila que pode crescer nas faixas de temperatura de 7 a 47,8°C, sendo melhor para o seu desenvolvimento a temperatura de 35°C. O intervalo de pH para crescimento é de 4,5 a 9,3 tendo como ótimo de 7,0 a 7,5. (FDA, 2012). Para a produção de enterotoxinas a faixa de temperatura ótima fica entre 40°C a 45°C, podendo ainda ser produzidas a partir de 10°C, todavia de forma mais lenta (FRANCO e LANDGRAF, 2008). É uma bactéria tolerante ao sal, tem bom desenvolvimento em meios com 10% de NaCl e pode crescer em atividade de água de 0,83 a 0,99. Por não ser resistente ao calor pode ser destruído em processos que empreguem calor de forma mais branda como a pasteurização, porém a sua toxina que possui elevada resistência térmica pode permanecer no alimento mesmo em processos com altas temperaturas (SILVA *et al.*, 2021).

Estima-se que *S. aureus* seja persistente em 20% da população em geral, enquanto outros 60% são portadores intermitentes. As narinas anteriores são o local de colonização em humanos (PINCHUK, BESWICK e REYES, 2010).

Dentre os vários metabólitos que podem ser produzidos pelo *S. aureus*, as enterotoxinas apresentam risco a saúde (LABBÉ e GARCIA, 2013).

Os sintomas ocasionados pela intoxicação alimentar com estas enterotoxinas tem início rápido, sendo em torno de 2-8 horas, apresentando náuseas, vômitos, cólicas abdominais, muitas vezes desaparecendo em torno de 24-28 horas, porém em alguns casos graves pode ser necessário a hospitalização (ARGUDIN, MENDOZA, e RODICIO, 2010). Devido ao vômito e a diarreia serem os principais sintomas da intoxicação, o quadro de desidratação é a complicação mais comum (FDA, 2012).

Em virtude de diagnósticos incorretos, surtos não relatados e até exames laboratoriais inadequados, a real incidência de intoxicação alimentar por enterotoxinas estafilocócicas pode estar subestimada (ARGUDIN, MENDOZA, e RODICIO, 2010).

Seguindo regras internacionais as enterotoxinas de *S. aureus* são nomeadas como SE, seguido da letra relacionada a sequência de descoberta após a

comprovação de sua atividade emética. Entre as enterotoxinas descobertas até o presente momento as SEA, SEB, SEC, SED e SEE são as mais clássicas (FDA, 2012).

Proteínas com cadeia polipeptídica curta, as enterotoxinas estafilocócicas são solúveis em água e solução salina. As enterotoxinas são proteínas de massa molecular variando de 22-30KDa, não glicosiladas, e de longa vida média, que são secretadas durante a fase exponencial de diferentes cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas. SEA apresenta tamanho molecular de 27,1KDa, SEB tamanho molecular 28,4KDa e SEC tamanho molecular 27,6KDa. São resistentes ao calor, podendo permanecer nos alimentos após tratamento térmico (NECIDOVA, L. *et al.*, 2019).

As enterotoxinas que tiveram o potencial emético demonstrado em estudos realizados com macacos receberam a designação em sua nomenclatura com SE seguido da letra relacionado a sua sequência de descoberta. As que não tiveram seu potencial emético demonstrado em macacos receberam a designação de SE acrescido da letra I e a letra relacionado a sua descoberta. A exceção a esta regra é SEF (nomenclatura original), atualmente denominada Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) (FISHER; OTTO; CHEUNG, 2018).

As enterotoxinas estafilocócicas mais comuns encontradas são SEA e SEB, sendo esta última já estudada como potencial uso para arma biológica no período da Guerra Fria, considerando a sua estabilidade, potencial, simplicidade de produção e dispersão em forma de aerossol (PINCHUK, BESWICK e REYES, 2010). O Centro de Controle de Prevenção de Doenças – CDC que classifica os agentes biológicos em categorias conforme critérios definidos, apresenta a SEB como parte da categoria B, que engloba os agentes biológicos de segundo maior risco por serem ou apresentarem potencial para serem utilizados como armas biológicas (SOBRAL, 2017). No manual de campanha do Exército Brasileiro de 2016, onde apresenta diretrizes para a defesa diante do efeito de agentes químicos, biológicos, radiológicos e nucleares, a SEB entra no quadro de agentes biológicos, como toxina com provável método de disseminação por aerossol e sabotagem, de baixa letalidade, mas de viabilidade estável (BRASIL, 2016).

Nos Estados Unidos, SEA é responsável por aproximadamente 80% dos casos de surtos de intoxicação alimentar enquanto SEB é responsável por 10% dos casos (PINCHUK, BESWICK e REYES, 2010).

A ingestão de uma dose menor que 1 μ g pode provocar sintomas da intoxicação e esta quantidade é atingida quando a população de *S. aureus* atinge valores acima de 10⁶ UFC/g no alimento. A sensibilidade de cada indivíduo pode variar e pessoas mais sensíveis podem apresentar sintomas após a ingestão de 100-200ng de enterotoxinas (SILVA *et al.*, 2021). A doença tem um curto período de incubação variando de apenas alguns minutos a horas desde que a toxina é pré-formada. A intoxicação raramente é letal e os idosos são mais suscetíveis (PINCHUK, BESWICK e REYES, 2010).

As enterotoxinas são altamente estáveis, muito resistentes às enzimas proteolíticas, como pepsina e tripsina, explicando sua atividade no sistema digestivo. Com notável capacidade de resistir ao calor e ao ácido, essas proteínas não desnaturam com aplicação de calor leve de cozimento, quando o alimento está contaminado, podendo provocar gastroenterite e êmese (PINCHUK, BESWICK e REYES, 2010). As enterotoxinas podem resistir à fervura de 20 a 60 minutos e são capazes de manter-se ativas após acondicionamento em autoclave à 120°C por 15 minutos (BAER *et al.*, 1976; FURLANETTO *et al.* 1987; WENDPAP e ROSA, 1993). Este fato explica a presença da toxina em alimentos mesmo com contagem baixa de *S. aureus*, pois as células podem ter sido destruídas durante o processamento ou preparo, e a toxina por apresentar estabilidade, permanece no alimento.

Portadores de *S. aureus* que não fazem uma correta higienização das mãos, podem contaminar os alimentos durante a manipulação e possibilitar assim a multiplicação do microrganismo com produção de toxinas. É possível que estes alimentos contaminados não apresentem características de mal cheiro ou estragado, induzindo assim o seu consumo. Para prevenir intoxicação alimentar, além da correta assepsia das mãos durante o preparo e ao servir os alimentos, é necessário que estes sejam armazenados dentro de temperatura adequada, de refrigeração e nunca mantendo estes alimentos mais do que uma hora em temperatura acima de 32°C (CDC, 2018).

As principais medidas de prevenção de contaminação do leite por enterotoxinas são evitar a contaminação inicial por *S. aureus*, consumir leite tratado termicamente e evitar que ocorra interrupção da cadeia de frio durante as etapas de produção e processamento (NECIDOVA, L. *et al.*, 2019).

3.3 OCORRÊNCIA EM ALIMENTOS

Ao lado da *E. coli*, *Shigella*, *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp., o *S. aureus* está entre os principais microrganismos produtores de toxinas responsáveis por intoxicação e toxinfecção alimentar (FISHER; OTTO; CHEUNG, 2018).

Para a multiplicação de *S. aureus* e a produção de suas toxinas no alimento existem pontos importantes a serem considerados, tais como as características do alimento, seu armazenamento, a manipulação.

Dentre os principais alimentos relacionados com surtos estão os produtos lácteos, produtos cárneos, saladas e doces, nos quais houve excesso de manipulação e permanência do alimento por um tempo prolongado em temperatura ambiente. Nos casos de intoxicação humana, os alimentos normalmente implicados não foram mantidos sob refrigeração (abaixo de 10°C) ou não foram suficientemente aquecidos (acima de 45°C). Os estafilococos estão presentes no ambiente, sendo encontrados no ar, no solo, poeira, esgoto e água. Nos seres humanos estão presentes principalmente nas vias nasais, garganta e pele, portanto, a contaminação dos alimentos pode ocorrer através de tosses, espirros e contato da pele de indivíduos portadores ou com quadro de infecções (SILVA *et al.*, 2021).

A contaminação do leite e seus derivados pode ocorrer quando o animal apresenta mastite, uma inflamação na glândula mamária, causada principalmente pela infecção por *S. aureus*. Este pode ainda colonizar a pele e o canal que leva às glândulas mamárias, predispondo às infecções intramamárias. A transmissão ocorre durante a etapa de ordenha (QUINN *et al.*, 2005). A presença de *S. aureus* em leites industrializados é ocasionada geralmente onde há uma linha de produção com condições higiênicas - sanitárias ineficientes, o que possibilita a multiplicação do microrganismo, que embora possa ser

destruído com o tratamento térmico, sua toxina formada é termorresistente (SILVA, 2021).

Para os queijos esta detecção de enterotoxinas faz-se necessária, porque se a etapa de fermentação deste alimento ocorrer de forma lenta, existe a possibilidade do *S. aureus* se multiplicar e produzir toxina, e embora a bactéria seja destruída no decorrer da fase de maturação do queijo as toxinas permanecerão no alimento (ICMSF, 2018). Se o gado leiteiro apresenta mastite estafilocócica e o leite é utilizado para a produção de queijos há também chances de haver a intoxicação alimentar pela formação de toxinas (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Com impacto significativo na produção do leite, a mastite bovina afeta a qualidade do produto e saúde do animal, ocasionando para a indústria de laticínios perdas econômicas. *S. aureus* é um dos principais microrganismos responsáveis pela mastite bovina. Durante o processo de ordenha, se há infecção subclínica ou clínica na glândula mamária, a contaminação por *S. aureus* é facilmente disseminada para o leite (DIAB *et al.*, 2021).

Em uma investigação realizada em três linhas de queijo Minas frescal foi detectado uma taxa de 51,6% de contaminação por *S. aureus* nas amostras avaliadas (ALVES *et al.*, 2018).

No estado de Minas Gerais de acordo com o trabalho realizado por Cavicchioli *et al.* (2015) em 11 fazendas leiteiras foram avaliadas 53 amostras de leite de cabra cru, sendo detectado a presença de genes relacionados a produção das enterotoxinas SEC, SEE, SEA e SEB. Desta forma identificou-se que o leite de cabra com seus derivados são fontes potenciais de patógenos e enterotoxinas.

Na pesquisa realizada durante 8 meses em cinco laticínios no Brasil por Dittmann *et al.* (2017) foi identificada a ocorrência de *S. aureus* em 7,4% das amostras coletadas de matéria prima, produto acabado, superfície em contato com o alimento e superfícies sem contato direto.

De acordo com o estudo realizado por DIAB *et al.* (2021) em 680 amostras de leite de 170 vacas, detectou-se em 23,1% dos animais a ocorrência de mastite e a presença de *S. aureus* em 33% amostras detectadas com mastite clínica.

Neste mesmo estudo foram avaliadas 86 amostras de leite humano, que apresentaram em 38% a presença de *S. aureus*.

Em estudo realizado na cidade de Botucatu onde foram avaliadas 172 amostras de sobremesas, sanduiches e salgadinhos comercializados, foi detectado em 15,1% das amostras a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, contendo cepas positivas enterotoxigênicas, com a toxina SEC mais detectada (ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2007).

AHMED *et al* (2021) analisaram 400 amostras de alimentos coletadas em diferentes áreas do estado de Cartum, onde detectaram a presença de *S. aureus* em 34% delas. Os alimentos analisados incluíam queijo, derivados de carne, peixe e leite cru.

Nos Estados Unidos o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estima que a intoxicação alimentar ocasionada por estafilococos, provoque a cada ano em torno de 241.188 registros de doenças, 1.064 hospitalizações e 6 mortes (FDA, 2012). No estado da Flórida - EUA, nos anos de 2016 e 2017 foram registrados 11 surtos alimentares em que *Staphylococcus* foi detectado como o agente etiológico, ocasionando 254 registros de doenças e 23 hospitalizações (CDC, 2022).

Um surto de intoxicação alimentar com *S. aureus* ocorreu no Texas onde 1.364 crianças apresentaram sintomas após o consumo de uma salada de frango. Pesquisas revelaram que a contaminação ocorreu no momento de desossa do frango e as falhas com temperatura de armazenamento e manipulação ocasionaram a proliferação e produção das enterotoxinas (LABBÉ e GARCIA, 2013).

Em um casamento na Alemanha, após a ingestão de diversos alimentos, onde incluía panqueca recheada com frango, várias pessoas apresentaram sintomas de gastroenterite aguda. Após a investigação identificou-se a presença de *S. aureus* e a enterotoxina A (JOHLER *et al.*, 2013).

S. aureus é o único patógeno capaz de se multiplicar em leite condensado com açúcar devido a atividade de água deste alimento ser em torno de 0,85. No entanto se este alimento se encontra armazenado em estado de anaerobiose, não ocorre a sua multiplicação e formação das enterotoxinas (ICMSF, 2018).

Devido a este fato a nova legislação que entrou em vigor solicita a análise em doces de base láctea que não são comercialmente estéreis.

Nos produtos lácteos desidratados as enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas podem ser encontradas de forma esporádica e em níveis muito baixos. Porém quando há falhas nas boas práticas de higiene ocorrendo manipulação errônea destes alimentos, com a reidratação, e posterior armazenamento em temperatura inadequada, pode ser proporcionado ambiente para a multiplicação de microrganismos e aumento do nível de enterotoxinas (ICMSF, 2018).

Nos alimentos prontos para consumo na qual são adicionados vários ingredientes, é necessário monitorar a qualidade dos mesmos em relação à presença de *S. aureus* e da toxina, pois os riscos aumentam com a associação destes ingredientes (ICMSF, 2018).

Em Ilinois ocorreram quatro surtos de intoxicação alimentar atingindo mais de 100 pessoas, depois que ingeriram uma variedade de sobremesas da mesma padaria. A equipe de investigação detectou a presença de *S. aureus* enterotoxigênico produtor de diversas enterotoxinas (HAIT *et al.*, 2012).

CAMPOS *et al* (2022) realizaram um estudo com massa de pão de queijo contaminada artificialmente com a enterotoxina SEA e detectaram que mesmo após o tratamento térmico em forno a 180°C por 35 minutos não foi suficiente para inativação da enterotoxina. Este estudo indicativo reforçou a importância do controle de qualidade das matérias primas utilizadas no preparo dos alimentos.

Com a atual mudança nos hábitos alimentares, o consumo de suplementos tem aumentado, dentre estes àqueles de base proteica, comercializados na forma de barra ou pó. Para esta categoria nos produtos que são adicionados proteínas de base láctea, segundo a RDC 724/22, também é exigido a análise de enterotoxinas estafilocócica. Nestes é adicionado o soro de leite, um subproduto obtido do processo da fabricação de queijos, adicionado em outros produtos como fonte de proteína. A inclusão de suplementos proteicos de base láctea na referida Resolução leva em consideração produtos que podem apresentar baixa contagem de Estafilococos coagulase positiva, contudo apresentam algum risco de presença de enterotoxinas devido à adição de ingredientes a base de leite. (ANVISA, 2020).

3.4 MÉTODOS DE ANÁLISES

Diferentes métodos têm sido desenvolvidos para a detecção de enterotoxinas estafilócicas em alimentos, dentre estes são descritos os métodos convencionais, como testes em animais e sorológicos, os métodos moleculares, os métodos cromatográficos e as técnicas baseadas em imunoenaios enzimáticos e imunossensores.

Os testes em animais são os mais antigos e são baseados no fornecimento do alimento ao animal, geralmente macacos, e análise dos sintomas e alterações fisiológicas, como vômito e diarreia. Foram utilizados inicialmente em estudos de saúde pública e para avaliar o efeito de cada enterotoxina, contudo para fins práticos e análise de alimentos, não têm sido utilizados (WU *et al.*, 2016).

De acordo com Bennett (2004) os métodos sorológicos de forma geral são divididos nos tipos de reação antígeno-anticorpo, o teste de imunodifusão em gel por precipitação direta e os ensaios de aglutinação. Como os anticorpos existem no soro, as reações antígeno/anticorpo *in vitro* são levadas em consideração nestes testes. O teste de difusão em gel é baseado na precipitação produzida pela interação antígeno/anticorpo, enquanto o teste de aglutinação é baseado na aglutinação de células ou partículas revestidas com anticorpos (WU *et al.*, 2016). Alguns autores reportaram o uso da reação de precipitação para análise de enterotoxinas em alimentos (HALL *et al.*, 1963; READ *et al.*, 1965) e teste de aglutinação de partículas de látex revestidas com anticorpos anti-SEB específicos (SALOMON e TEW, 1968, LEE e LIN, 1984), contudo atualmente não têm sido utilizados para análise de alimentos pois são ensaios semi-quantitativos e de baixa especificidade e sensibilidade (WU *et al.*, 2016).

Técnicas baseadas em biologia molecular que incluem a reação em cadeia da polimerase (PCR), também têm sido utilizadas para detectar os genes relacionados à produção de enterotoxinas em alimentos, através do uso de conjuntos de primers para amplificar os genes e enzimas envolvidas na produção. A detecção de SEs por PCR e suas variantes, PCR em tempo real, PCR multiplex, RT-PCR e Loop-amplificação isotérmica mediada (LAMP), têm sido reportadas na literatura. A PCR também tem a vantagem de ser combinada com outras técnicas, como o número mais provável (MPN-PCR) e o ensaio

imunoenzimático (PCR-ELISA), que podem fornecer resultados sensíveis. No entanto, podem ocorrer resultados falsos negativos decorrentes da interferência com a lise da célula-alvo, ou a degradação do ácido nucleico. Na rotina ainda é pouco usada devido à necessidade de pessoal altamente qualificado (WU *et al.*, 2016). Além disso, a presença dos genes relacionados à produção de enterotoxina pode não estar relacionada diretamente com a contaminação do alimento pela enterotoxina. A análise por PCR é capaz de mostrar se o gene está ou não presente na amostra, porém não indica se houve produção da enterotoxina (VASCONCELOS; CUNHA, 2010).

A PCR é uma ferramenta importante e de alta contribuição nas pesquisas, porém ainda é necessário a confirmação da presença física da toxina em alimentos suspeitos de ocasionarem intoxicação alimentar estafilocócica (FISHER; OTTO; CHEUNG, 2018).

Outra técnica reportada na literatura para detectar enterotoxinas em alimentos é a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC/MSMS) e já foi reportada em diversos trabalhos (SOSPEDRA *et al.*, 2012, BAO, LETELLIER e BEAUDRY, 2012, MURATOVIC *et al.*, 2015). As principais vantagens desta técnica é a alta sensibilidade e preparo simplificado da amostra para análise, contudo, assim como as técnicas moleculares, exige mão de obra especializada, além disso, equipamentos complexos e de alto custo de manutenção, portanto é uma técnica cara para ser implementada em rotina.

As técnicas mais comumente usadas são os testes de imunoensaio enzimáticos com marcadores, dentre estas a ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), com vários kits comerciais presentes no mercado. A técnica de ELISA baseia-se no princípio da interação antígeno-anticorpo e é uma ferramenta fundamental na detecção de agentes biológicos, incluindo toxinas como as SEs. O antígeno capturado no suporte contendo os anticorpos é detectado por uma reação específica, e o composto cromogênico formado é detectado por uma enzima específica produzindo uma alteração colorimétrica que é detectada no leitor do equipamento. Esta técnica apresenta as vantagens de alta sensibilidade e rapidez na análise, contudo pode apresentar resultados falsos positivos devido às reações inespecíficas com a proteína. Para alimentos que passaram por tratamentos térmicos pode haver resultados falso negativos,

pois as enterotoxinas podem estar agregadas, reduzindo a reação com o anticorpo (WU *et al.*, 2016). Vernozy-Rozand *et al.* (2004), compararam três kits presentes no mercado, VIDAS® SET (BioMérieux), Vidas® SET2 (BioMérieux) e TRANSIA PLATE (Diffchamb), realizando os testes com diferentes matrizes de alimentos, e verificaram que o kit VIDAS® SET2 apresentou melhor resultado, com 100% de especificidade (sem a presença de resultados falsos positivos) e limite de detecção menor que 0,5ng/g para as enterotoxinas A e B.

O Manual Analítico Bacteriológico (BAM) indica a utilização de kits disponíveis comercialmente, os quais detectam as enterotoxinas SEA a SEE, através de métodos de detecção de imunoensaio polivalentes ligados a enzima (ELISA) ou imunoensaio fluorescentes ligados a enzima (ELFA), ressaltando a necessidade de etapas de extração da enterotoxina do alimento suspeito (FDA, 2022).

A ISO 19020:2021 - Método horizontal para a detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos, prescreveu a análise com duas etapas principais, sendo a primeira a etapa de extração seguida de concentração baseada no princípio de diálise, e a segunda etapa a detecção imunoenzimática através de kits de detecção disponíveis comercialmente.

3.5 LEGISLAÇÃO

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº12 de 2 de janeiro de 2001, que estabelecia os padrões microbiológicos que deviam ser seguidos, para que os alimentos chegassem ao consumidor final de forma segura, foi revisada sofrendo alterações. Em 2019, foi publicada a RDC nº 331 complementada com a Instrução Normativa (IN) nº 60 que entraram em vigor a partir de 23 de dezembro de 2020, estabelecendo os novos padrões microbiológicos para alimentos prontos ofertados ao consumidor. Visando uma melhor organização das definições e adequações de redação, em 2022 esta Resolução e Instrução Normativa foram revisadas, sendo substituídas pela RDC nº 724 e IN nº 161 que entraram em vigor a partir de 1º de setembro de 2022.

Dentre as alterações realizadas na legislação que define os novos padrões microbiológicos, foi acrescentada a necessidade de análise de enterotoxina

estafilocócica nos seguintes grupos de alimentos: queijos, produtos lácteos processados fundidos, produtos lácteos em pó, doces de base láctea não comercialmente estéreis, misturas em pó para o preparo de bebidas de base láctea, suplementos (pó ou em barra) de base proteica e alimentos prontos para o consumo. Nas análises para detecção das enterotoxinas é necessário que o método utilizado tenha o limite de detecção menor ou igual a 1ng/g, limite este que foi estabelecido em conformidade com os critérios de segurança que são adotados pela Comunidade Europeia, Regulamento (EC) nº 2073/2005 (ANVISA, 2020). As análises são realizadas em amostra representativa (n=5 e c=0) e nenhuma unidade amostral pode apresentar contaminação por enterotoxina estafilocócica, e o método de detecção deve atender ao limite de detecção estabelecido.

Para a definição destas categorias levou-se em consideração as características do *Staphylococcus*, sua capacidade de multiplicação e produção de toxinas nestes alimentos. Essas alterações na legislação auxiliam na segurança dos alimentos e na prevenção de ocorrência de surtos alimentares.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), situado na cidade de Campinas – SP.

4.1 AMOSTRAS

Foram coletadas 80 amostras de alimentos comercializados na cidade de Campinas – SP. A distribuição das amostras ocorreu de acordo com as classes de alimentos da legislação RDC 724/22 e IN 161/22 em que é exigido a análise de enterotoxina estafilocócica. Para as seguintes categorias foram coletadas:

- Categoria 9b – Queijos: 30 amostras;
- Categoria 9c - Produtos lácteos processados fundidos, incluindo requeijão e misturas lácteas pastosas: 10 amostras;

- Categoria 9e - Produtos lácteos em pó, incluindo leite, compostos lácteos, soro de leite e concentrados proteicos de leite ou de soro: 10 amostras;
- Categoria 9f – Doce de leite, leite condensado e doce de base láctea, não comercialmente estéreis: 10 amostras;
- Categoria 9j – Misturas em pó para o preparo de bebidas de base láctea: 10 amostras;
- Categoria 15a – Suplementos em pó e em barra (produtos de base láctea): 10 amostras.

4.2. CONTAGEM DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA

Foi utilizada a metodologia ISO 6888-1 (2018) para a contagem de Estafilococos coagulase positiva nas amostras.

Foram pesados 25g da amostra, seguido da diluição com água peptonada 0,1% e homogeneização em homogeneizador de amostras tipo *stomacher* por 1 min. Foi realizada a diluição decimal seriada em tubos com o mesmo diluente e plaqueados em superfície 0,1ml de cada diluição em placas de Ágar Baird-Parker (BP), previamente preparadas e secas. Foi espalhado o inóculo com uma alça de Drigalski nas placas de maior para a menor diluição, até absorção de todo o excesso de líquido. As placas foram incubadas invertidas a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ por $48\pm 2\text{h}$. Após a incubação foram selecionadas colônias típicas (colônias pretas ou cinzas, brilhantes, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente) e atípicas (colônias pretas brilhantes, com ou sem área esbranquiçada nas bordas e/ou halo transparente pouco visível ou ausente; colônias cinzas, sem zona opaca). Foram selecionadas 5 colônias típicas ou atípicas (quando não estiveram colônias típicas presentes) e estas foram submetidas ao teste de coagulase através da adição de 0,1mL de cultura (em caldo BHI) + 0,3mL de Coagulase Plasma-EDTA (plasma de coelho com EDTA). Com movimentos circulares ocorreu a mistura, porém sem agitar os tubos, para não interferir na coagulação. Os tubos foram incubados a 35°C e foi observado após quatro a seis horas se houve formação de coágulo. No caso de teste negativo, foi completada a incubação para 24 horas e examinado os tubos novamente. Foram considerados como coagulase positiva todos os tubos que

apresentaram formação de coágulo que ocupou mais da metade do volume original de líquido. Foi realizado a incubação do controle positivo (0,1mL de cultura de *Staphylococcus aureus* cultivada em caldo BHI em 0,3ml de Coagulase Plasma-EDTA) em paralelo ao teste. Os resultados foram reportados em UFC/g em função do número de colônias típicas, diluição usada e porcentagem de colônias confirmadas no teste de coagulase.

4.3 ANÁLISE DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS – EXTRAÇÃO

O preparo das amostras para a análise de toxinas estafilocócicas, seguiu o protocolo do método oficial de análise da AOAC nº 2007.06, baseado em detecção através de ensaio imunoenzimático por fluorescência (ELFA). Esta metodologia possibilita a detecção das enterotoxinas SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED e SEE, através do kit de detecção disponível comercialmente, o Vidas® SET2 da empresa Biomerieux.

Baseado no método ELFA, o kit Vidas® SET2, é capaz de detectar as enterotoxinas SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED e SEE com limite mínimo de detecção de 0,5ng/g (FDA, 2022). De acordo com a legislação vigente (RDC 724/22 e IN 161/22) o limite mínimo de detecção para o método utilizado deve ser de 1ng/g, portanto o método selecionado para as análises deste estudo atende ao exigido em lei.

Para cada matriz de alimento foram seguidos os protocolos específicos de extração.

4.3.1 Produtos lácteos líquidos: Em 25ml de amostra foi efetuado o ajuste de pH para a faixa de 3,5 a 4,0 utilizando a solução de HCl 5N. Foi realizado a centrifugação por 15 minutos na rotação de 3000-5000g, dentro da faixa de temperatura de 18°C a 25°C. O sobrenadante foi coletado e ajustado o pH para a faixa de 7,5 a 8,0 utilizando a solução de NaOH 1N. Foi realizado a centrifugação por 15 minutos na rotação de 3000-5000g, na faixa de temperatura 18°C a 25°C. Com auxílio de uma micropipeta foi coletado 0,5ml da suspensão e adicionado no primeiro poço do barrete do kit Vidas® SET2. O barrete junto com o cone que compõem o kit, foram acoplados no equipamento MiniVidas® para análise.

4.3.2 Produtos lácteos: Foram pesados 25g de amostra, adicionados 40ml de água destilada a $38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ seguido da homogeneização, em homogeneizador de amostras tipo *stomacher* na velocidade 260 bpm por 3 minutos. Após 30 minutos de descanso da amostra, na faixa de temperatura de 18°C a 25°C , foi verificado o pH e efetuado o ajuste com solução de HCl 5N para a faixa de 3,5 a 4,0. A amostra foi centrifugada por 15 minutos (rotação 3000-5000g, temperatura 18°C a 25°C) e foi coletado o sobrenadante. Foi realizado o ajuste do pH para a faixa de 7,5 a 8,0 utilizando a solução de NaOH 1N e realizada centrifugação por 15 minutos (rotação 3000-5000g, temperatura 18°C a 25°C). Uma alíquota de 0,5ml da suspensão foi coletada e adicionada no primeiro poço do barrete do kit de análise. Barrete e cone foram adicionados no equipamento MiniVidas® para realização do ensaio.

4.3.3 Alimentos lácteos desidratados: foi realizada a reidratação do alimento conforme indicação do fabricante. Amostra foi deixada em descanso por 1 hora na faixa de temperatura de 18°C a 25°C . Após este período foram amostrados 25 ml da amostra diluída seguindo as mesmas etapas de extração para produtos lácteos líquidos.

4.3.4 Suplementos de base láctea: Foi seguido o protocolo geral de extração para alimentos. Em 25 g de amostra foram adicionados 25ml do tampão de extração reconstituído. Para a reconstituição foi realizada a diluição de 1 parte de R1 (solução fornecida junto ao kit Vidas® SET2) para 18 partes de água destilada estéril. Após a adição do tampão de extração, a amostra foi homogeneizada, em homogeneizador tipo *stomacher* por 3 minutos na velocidade de 260 bpm, seguido do descanso por 15 minutos na faixa de temperatura de 18°C a 25°C . A amostra foi centrifugada por 15 minutos na rotação 3000-5000g e temperatura 18°C a 25°C . Foi coletado o sobrenadante e verificado o pH, sendo o mesmo ajustado para a faixa de 7,5 a 8,0 com a solução de NaOH 1N. Uma alíquota de 0,5ml foi adicionada no primeiro poço do barrete para análise no equipamento MiniVidas®. Barrete e cone foram adicionados no equipamento MiniVidas® para realização do ensaio.

4.4 ANÁLISE DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS – EQUIPAMENTO MINIVIDAS®

Para realização da análise de enterotoxina nas amostras foi utilizado o equipamento MiniVidas® da empresa Biomeriueux (Figura 1), com o kit de detecção Vidas® SET2 (Figura 2), sendo este capaz de detectar as enterotoxinas SEA, SEB, SEC₁, SEC₂ SEC₃, SED e SEE.

O barrete (VIDAS® Barrete simples de reagentes) que compõe o kit contém os reagentes prontos para uso distribuídos em poços, sendo este uma tira de reagentes selada. O cone (Cone SPR VIDAS®) além de ser utilizado como dispositivo de pipetagem, também é um recipiente de fase sólida com seu interior revestido de anticorpos.

Após a adição da alíquota da amostra extraída no primeiro poço do barrete, o equipamento realiza as demais etapas, que incluem a aspiração, dispensação da amostra no cone e a ligação dos antígenos presentes aos anticorpos revestidos no interior do mesmo. No final dos ciclos do processo, quando há ligação da amostra com o anticorpo, a enzima catalisa a hidrólise do substrato 4-metil-umbeliferil fosfato, sendo detectado através de fluorescência.

O resultado final é obtido através da leitura no equipamento MiniVidas® de forma qualitativa, apresentado como Valor de Teste (VT). Valor de VT <0,13 indica resultado negativo (ausência de enterotoxina estafilocócica) e resultado positivo para VT ≥ 0,13 (presença de enterotoxina estafilocócica).



Figura 1 – Equipamento MiniVidas® Biomeriueux (Fonte: LabMakelaar Benelux B.V, 2022)



Figura 2 – Kit Vidas® SET2, barrete e cone (Fonte: Biomerieux, 2022).

4.5 TESTES PRELIMINARES REALIZADOS COM CEPAS DE *S. AUREUS*

Antes da realização das análises de enterotoxinas nas amostras de alimentos adquiridas para o estudo, foram planejados testes com cepas padrões de *S. aureus* e com o padrão de enterotoxinas, com o objetivo de avaliar a performance do método e as condições de produção da enterotoxina pela cepa de *S. aureus*.

Duas cepas de *S. aureus* subespécie *aureus* disponíveis no Laboratório de Microbiologia do CCQA (ATCC 12600 e ATCC 6538) e uma cepa (CCT 0676) reconhecida como produtora da enterotoxina A, que foi adquirida da Fundação André Tosello, foram selecionadas para este trabalho.

Inicialmente as cepas foram ativadas e avaliadas quanto ao aspecto morfológico (formato das colônias e células, coloração de Gram) e bioquímicos (teste catalase e coagulase).

Foi preparada a suspensão de 10^9 UFC/ml com as três cepas utilizando o equipamento Densimat escala McFarland 5,0 e plaqueado o inóculo após diluição decimal seriada em ágar Baird Parker.

Tendo o conhecimento da concentração de células na suspensão, estas foram inoculadas em caldo BHI (caldo Infusão Cérebro Coração), em amostras de leite e de queijo, atingindo nível de inoculação de 10^4 UFC/ml ou g. As amostras inoculadas foram mantidas em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas e foi realizado o plaqueamento e a análise de enterotoxinas.

4.6 TESTES PRELIMINARES REALIZADOS COM A ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA PARA AVALIAR A PERFORMANCE DO KIT VIDAS SET 2

Para avaliação do desempenho de detecção do equipamento MiniVidas®, foi adquirido o padrão de Enterotoxina Purificada A de *S. aureus*, para a contaminação de amostras com valores definidos da toxina.

O padrão de enterotoxina A (código S9399, Sigma-Aldrich) na forma em pó liofilizado foi adquirido da empresa Merck.

O padrão foi ressuspenso em água, atingindo concentração de 0,1mg/ml (padrão estoque). A partir desta solução foram preparados os padrões de trabalho nas concentrações de 500ng/ml e 2ng/ml, para inoculação nas amostras.

Foram realizados testes com a finalidade de avaliar o limite de detecção e o VT informado, inoculando 0,5ml do padrão de enterotoxinas nas concentrações de 500ng/ml e 2ng/ml no barrete do kit de detecção Vidas® SET2.

Amostras de queijo e leite foram artificialmente contaminadas com a solução padrão de enterotoxina da concentração de 500ng/ml. Estas foram mantidas em repouso por 30 minutos e em seguida foi realizado o procedimento de extração conforme o método oficial de análise da AOAC nº 2007.06. Para as amostras de queijo foi seguido o protocolo de extração para produtos lácteos e para as amostras de leite o protocolo de extração para produtos lácteos líquidos.

As concentrações de solução padrão de enterotoxina utilizadas nas amostras de queijo e leite contaminadas artificialmente foram:

- 1ppb: 25g de queijo contaminado com 0,05ml da solução de enterotoxina de concentração de 500ng/ml;
- 15ppb: 25g de queijo contaminado com 0,75ml da solução de enterotoxina de concentração de 500ng/ml;
- 1ppb: 25ml de leite contaminado com 0,05ml da solução de enterotoxina de concentração de 500ng/ml;
- 15ppb: 25ml de leite contaminado com 0,75ml da solução de enterotoxina de concentração de 500ng/ml.

Com os resultados obtidos foi analisado a ocorrência de perdas da enterotoxina durante as etapas de extração. Estas duas matrizes foram selecionadas por distinguirem em sua composição e estado físico. O leite como

matriz líquida com menor teor de gordura, apresenta características que proporciona a melhor distribuição da enterotoxina e menor perda durante a extração, em comparação ao queijo, que se mostra uma matriz mais complexa.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA

A atividade de água das amostras estudadas foi mensurada pelo Analisador de Atividade de Água Decagon, modelo AquaLab série 3TE.

Para a avaliação da performance do equipamento foram preparadas soluções de glicerol com atividade de água nos valores 0,991 e 0,884. As soluções em temperatura ambiente foram analisadas em triplicada, levando em consideração o desvio médio máximo aceito de $\leq 0,06$.

A análise de cada amostra foi realizada após homogeneização da mesma e acondicionamento nas cápsulas. Cada porção foi acondicionado em uma cápsula, utilizando quantidade suficiente para cobrir o interior dela, mas que não ultrapasse a metade de sua capacidade volumétrica. A capsula foi inserida no equipamento, fechada a tampa da câmara e aguardada a estabilização do equipamento para obtenção do resultado apresentado no display.

Para cada amostra analisada foi realizado o estudo em triplicata, sendo ao final realizado o cálculo da média de cada uma e o do desvio padrão.



Figura 3 – Equipamento analisador de Aw – AquaLab.modelo 3TE (Fonte: Manual de Operação, Versão 6, Decagon Devices).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONTAGEM DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA

As tabelas 01 a 06 apresentam os resultados da contagem de Estafilococos coagulase positiva para cada tipo de produto analisado.

Tabela 1: Contagem de Estafilococos coagulase positiva para as amostras categoria: queijos.

Amostra	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)
1 - Queijo Minas Frescal	$3,5 \times 10^7$
2 - Queijo Minas Frescal	$9,7 \times 10^6$
3 - Queijo Minas Frescal	$<10^2$
4 - Queijo Minas Frescal	$4,1 \times 10^6$
5 - Queijo Minas Frescal	$6,6 \times 10^7$
6 - Queijo Minas Frescal	$<10^2$
7 - Queijo Frescal de Soro de Leite	$<10^2$
8 - Queijo Minas Frescal	$<10^2$
9 - Queijo Minas Frescal	$<10^2$
10 - Queijo Minas Artesanal	$<10^2$
11 - Queijo Minas Frescal	$<10^2$
12 - Queijo Serra da Canastra	$<10^2$
13 - Queijo Meia Cura	$1,1 \times 10^7$
14 - Queijo Coalho	$<10^2$
15 - Queijo Minas Artesanal	$<10^2$
16 - Queijo Minas Artesanal	$<10^2$
17 - Queijo Minas Frescal	$<10^2$
18 - Queijo Minas Frescal	$<10^2$
19 - Queijo Minas Artesanal	$<10^2$
20 - Queijo Minas Artesanal	$<10^2$
21 - Ricota fresca	$<10^2$

Tabela 1: Contagem de Estafilococos coagulase positiva para as amostras categoria: queijos (continuação).

Amostra	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)
22 - Queijo tipo Fontina	$<10^2$
23 - Ricota defumada	$<10^2$
24 - Queijo Minas Artesanal	$<10^2$
25 - Queijo Minas Frescal	$<10^2$
26 - Queijo Minas Artesanal	$<10^2$
27 - Queijo Minas Padrão	$<10^2$
28 - Queijo Minas Artesanal	$1,0 \times 10^2$
29 - Queijo Minas Artesanal	$<10^2$
30 - Queijo Minas Artesanal	$3,9 \times 10^6$

Tabela 2: Contagem de Estafilococos coagulase positiva para as amostras categoria: produtos lácteos processados fundidos, incluindo requeijão e misturas lácteas pastosas.

Amostra	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)
1 - Requeijão cremoso	$<10^2$
2 - Requeijão cremoso	$<10^2$
3 - Requeijão cremoso	$<10^2$
4 - Produto lácteo cremoso sabor requeijão	$<10^2$
5 - Produto lácteo cremoso sabor requeijão	$<10^2$
6 - Requeijão cremoso	$<10^2$
7 - Produto lácteo cremoso sabor requeijão	$<10^2$
8 - Produto lácteo cremoso sabor 4 queijos	$<10^2$
9 - Produto lácteo fundido	$<10^2$
10 - Requeijão cremoso	$<10^2$

Tabela 3: Contagem de Estafilococos coagulase positiva para as amostras categoria: produtos lácteos em pó, incluindo leite, compostos lácteos, soro de leite e concentrados proteicos de leite ou de soro.

Amostra	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)
1 - Composto lácteo em pó	$<10^2$
2 - Composto lácteo em pó	$<10^2$
3 - Leite em pó integral	$<10^2$
4 - Leite em pó integral	$<10^2$
5 - Leite em pó integral	$<10^2$
6 - Leite em pó integral	$<10^2$
7 - Composto lácteo em pó	$<10^2$
8 - Composto lácteo em pó	$<10^2$
9 - Composto lácteo em pó	$<10^2$
10 - Composto lácteo em pó	$<10^2$

Tabela 4: Contagem de Estafilococos coagulase positiva para as amostras categoria: doce de leite, leite condensado e doce de base láctea, não comercialmente estéreis.

Amostra	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)
1 - Doce de base láctea	$<10^2$
2 - Doce de leite pastoso	$<10^2$
3 - Leite condensado	$<10^2$
4 - Leite condensado	$<10^2$
5 - Doce de base láctea	$<10^2$
6 - Doce de leite pastoso	$<10^2$
7 - Doce de base láctea	$<10^2$
8 - Doce de Leite pastoso	$<10^2$
9 - Doce de Leite pastoso	$<10^2$
10 - Doce de Leite pastoso	$<10^2$

Tabela 5: Contagem de Estafilococos coagulase positiva para as amostras categoria: mistura em pó para o preparo de bebida de base láctea.

Amostra	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)
1 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²
2 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²
3 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²
4 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²
5 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²
6 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²
7 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²
8 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²
9 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²
10 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²

Tabela 6: Contagem de Estafilococos coagulase positiva para as amostras categoria: suplemento proteico em pó e em barra.

Amostra	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)
1 - Suplemento proteico em pó	<10 ²
2 - Suplemento proteico em barra	<10 ²
3 - Suplemento proteico em pó	<10 ²
4 - Suplemento proteico em barra	<10 ²
5 - Suplemento proteico em barra	<10 ²
6 - Suplemento proteico em barra	<10 ²
7 - Suplemento proteico em barra	<10 ²
8 - Suplemento proteico em barra	<10 ²
9 - Suplemento proteico em barra	<10 ²
10 - Suplemento proteico em barra	<10 ²

Dentre as 80 amostras de alimentos analisadas, 8,7% apresentaram contagem de Estafilococos coagulase positiva.

Todas as amostras com contagem de Estafilococos coagulase positiva pertenceram à categoria de queijos e 20% destas apresentaram valores de

contagem acima do limite M (10^3 UFC/g) indicando resultados insatisfatórios com qualidade inaceitável de acordo com a legislação vigente (RDC 724/22 e IN 161/22), grupo 9, item b.

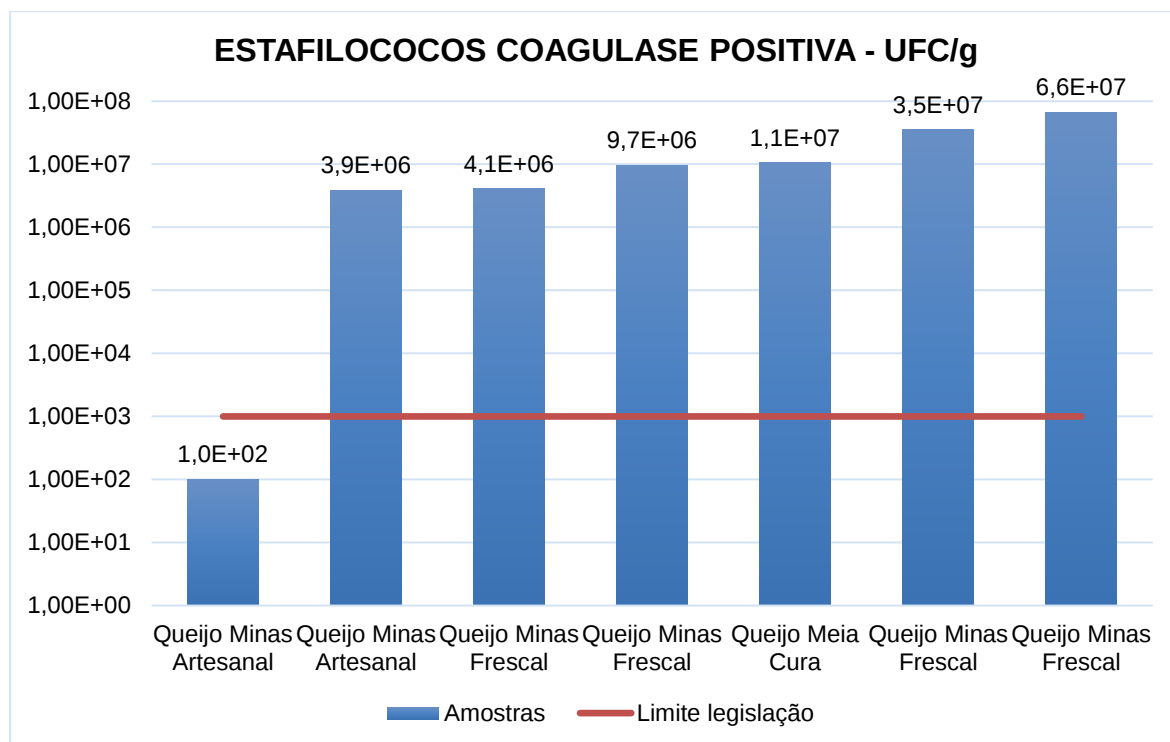


Figura 4. Representação gráfica comparativa de Estafilococos coagulase positiva: detecção em amostras de queijo x limite legislação.

A presença de *S. aureus* em um alimento não apresenta relação direta com a contaminação por enterotoxinas, visto que são necessárias condições específicas para sua produção e nem toda cepa é produtora de toxinas. A contaminação por enterotoxinas pode variar uma vez que cada alimento possui características distintas, o que podem dificultar ou facilitar o desenvolvimento microbiano e a produção de suas toxinas (JUNIOR *et al.*, 2019)

A contaminação de queijos por *S. aureus* é comum e foi reportada em diversos trabalhos (ALVES *et al.*, 2018, AHMED *et al.*, 2021, SILVA *et al.*, 2021) Dentre os alimentos relacionados aos surtos devido a ingestão de enterotoxinas estafilocócicas, o queijo é um dos principais alimentos, além de pratos prontos, embutidos e saladas (ICMSF, 2018). Devido à manipulação e eventuais condições higiênico sanitária em algumas indústrias de laticínios, a produção de queijo Minas Frescal é altamente susceptível a contaminação microbiana. Ademais, as suas

características físico-químicas favorecem a sobrevivência e desenvolvimento de bactérias patogênicas como *S. aureus* (SILVA, *et al.*, 2021).

Ahmed *et al* (2021) analisaram 100 amostras de queijos coletados no estado de Khartoum no Sudão em 2018 e detectaram a ocorrência de *S. aureus* em 20% das amostras, resultado similar a este trabalho. O grupo também pesquisou a presença de genes relacionados à produção de enterotoxinas nas cepas isoladas e o gene para a produção de enterotoxina B foi detectado em apenas isolados de duas amostras. Não foi realizada a investigação de enterotoxinas nestas amostras.

De acordo com o estudo realizado por SILVA *et al* (2023) características microbiológicas e físico-químicas de 56 amostras de queijos brasileiros (Minas Frescal, Minas Padrão e Minas Artesanal) produzidos a partir de leite pasteurizado ou leite cru foram avaliadas, sendo detectada em 34,32% delas a presença de *S. aureus*. Neste trabalho não foram detectados os genes relacionados a enterotoxinas nos isolados.

No estudo conduzido por VINHA, PINTO e CHAVES (2018) foi detectado a presença de Estafilococos coagulase positiva em 39,7% das amostras de queijo Minas Frescal produzidas por pequenas empresas na cidade de Viçosa, com contagem variando de 10 a $3,6 \times 10^6$ UFC/g, mas não foi analisado a presença de enterotoxinas estafilocócicas.

A Autoridade Europeia de Segurança Alimentar, informou que em 2015 as enterotoxinas estafilocócicas ocasionaram 434 surtos de doenças transmitidas por alimentos registrados. Em 39 surtos de forte evidência causados por enterotoxinas estafilocócicas, o queijo foi o alimento mais comumente implicado, seguido por alimentos mistos (AL-NABULSI *et al.*, 2020).

O leite é um alimento de natureza altamente nutritiva, servindo com um excelente meio de cultura para o crescimento de diversos microrganismos. Sua contaminação e de seus produtos derivados pode ocorrer ao longo de toda sua cadeia produtiva, o que torna uma tarefa complexa e desafiadora para as indústrias de laticínios. Boas práticas de higiene e boas práticas de fabricação devem ser aplicadas pela indústria de laticínios, independentemente do tamanho de sua escala de produção, juntamente com a identificação e o gerenciamento de possíveis fontes de contaminação (KNOWLES *et al.*, 2022).

5.2 DETECÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA

A tabela 7 apresenta os resultados enterotoxina estafilocócicas para cada categoria de alimento avaliado.

Tabela 7: Categoria de alimentos e detecção de enterotoxinas.

Categoria de alimento	Amostras analisadas (n)	Amostras positivas para enterotoxina (%)
9b - Queijos	30	1 (3,3%)
9c - Produtos lácteos processados fundidos, incluindo requeijão e misturas lácteas pastosas	10	1 (10%)
9e – Produtos lácteos em pó, incluindo leite, compostos lácteos, soro de leite e concentrados proteicos de leite ou de soro	10	0 (0%)
9f - Doce de leite, leite condensado e doce de base láctea, não comercialmente estéreis	10	0 (0%)
9j - Misturas em pó para o preparo de bebidas de base láctea	10	0 (0%)
15a – Suplementos em pó e em barra	10	0 (0%)
Total amostras analisadas	80	2 (2,5%)

N = número de amostras analisadas

Dentre os alimentos avaliados (total 80 amostras), foi detectada a presença de enterotoxina estafilocócica em apenas duas amostras (2,5%), sendo uma amostra na categoria de queijos e outra amostra na categoria produto lácteo processado fundido. Embora não tenha sido quantificado *Estafilococcus coagulans* positivos na amostra de produto lácteo processado fundido, foi confirmada a presença de enterotoxina, indicativo de morte das células durante o processamento e uso de matéria prima contaminada com a toxina e ou contaminação pós processo.

BORGES *et al.* (2008) analisaram 195 amostras coletadas de cinco lotes de produção de 23 pontos de linha de processamento de queijo coalho, detectando a

presença de enterotoxina estafilocócicas em 20% das amostras de leite cru, com consequente detecção no leite pasteurizado, na coalhada e no queijo produzido. As enterotoxinas presentes no leite cru não foram inativadas no processo de pasteurização o que permitiu que elas permanecessem no leite pasteurizado, na coalhada e no queijo analisados.

Outra amostra de queijo, avaliada neste estudo como negativo para a presença de enterotoxina, apresentou valor de VT 0,12, sendo este muito próximo ao limite de detecção (VT 0,13 é classificado pelo equipamento como positivo). Considerando o limite de detecção do método (0,5ng/g), é provável que esta amostra contenha a enterotoxina, porém não em quantidade suficiente para que o equipamento a detecte como positiva.

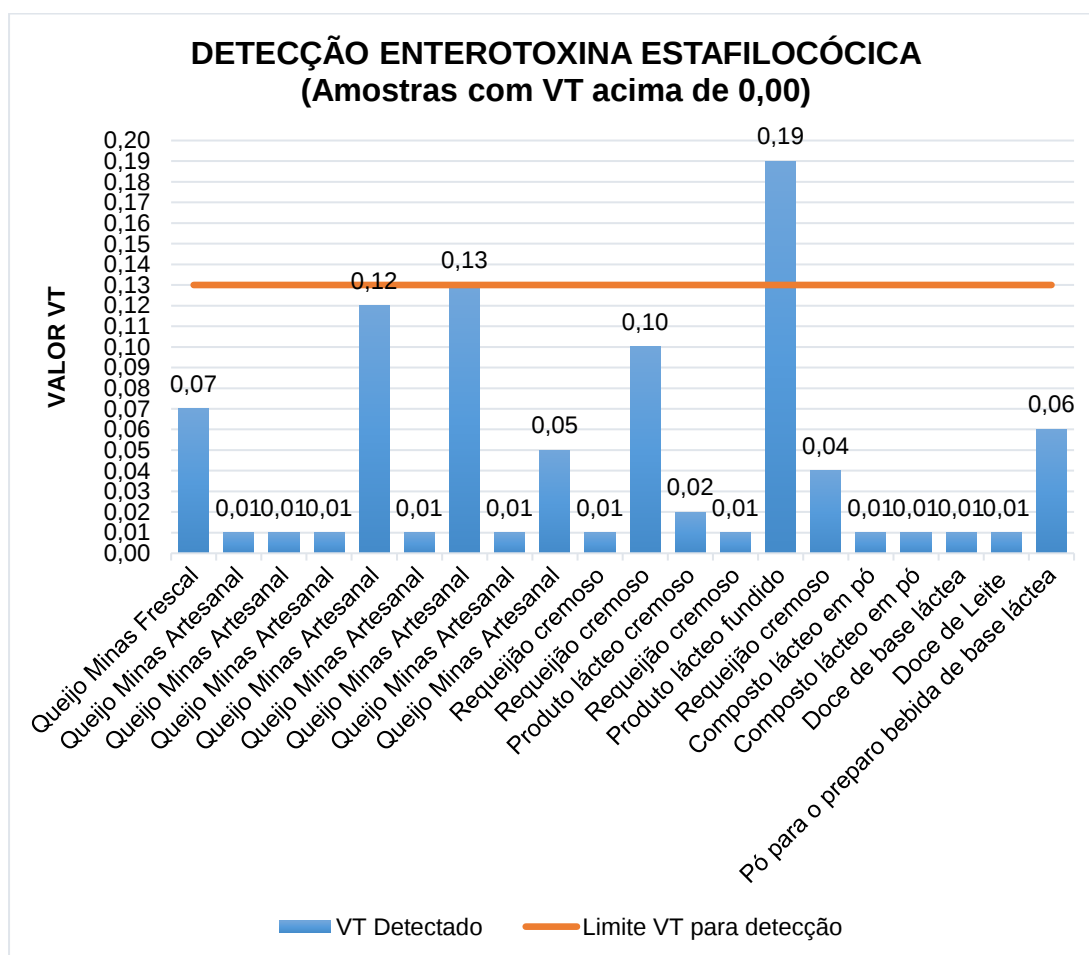


Figura 5. Representação gráfica comparativa para limite de detecção enterotoxina estafilocócica com valores (VT) obtidos em análise, método Vidas® SET2.

De acordo com SANTANA *et al.* (2010) a detecção de enterotoxinas estafilocócicas nos alimentos ocorre quando a contagem de *S. aureus* ultrapassa

10⁵ UFC/g, podendo este valor ser utilizado como parâmetro de quantidade mínima para detecção de enterotoxina. Na presente pesquisa não houve esta correlação uma vez que as amostras cuja presença de enterotoxina foi confirmada, a contagem não ultrapassou 1x10² UFC/g. Neste caso a contaminação pode estar relacionada a alguma falha no processo, como uso de matéria prima contaminada, contaminação pós tratamento térmico, condições inadequadas e estocagem. Com exceção dos queijos, todas as amostras avaliadas apresentam baixa atividade de água e foram submetidas a um processo de secagem/concentração, inviabilizando a multiplicação de células e o risco de produção de enterotoxinas. Nestes produtos o controle da qualidade da matéria prima utilizada é importante.

5.3 VALORES DE ATIVIDADE DE ÁGUA

A tabela 8 apresenta os valores de atividade de água das amostras analisadas.

Tabela 8: Resultado para análise de atividade de água (Aw)

Amostra	1	2	3	Média (DP)
Queijo Minas Frescal	0,976	0,975	0,976	0,976 (0,001)
Queijo Minas Frescal	0,978	0,977	0,977	0,977 (0,001)
Queijo Minas Frescal	0,981	0,981	0,981	0,981 (0,000)
Queijo Minas Frescal	0,979	0,980	0,980	0,980 (0,001)
Queijo Minas Frescal	0,971	0,971	0,971	0,971 (0,000)
Queijo Minas Frescal	0,978	0,977	0,977	0,977 (0,001)
Queijo Frescal de Soro de Leite	0,977	0,981	0,982	0,980 (0,002)
Queijo Minas Frescal	0,978	0,978	0,977	0,978 (0,001)
Queijo Minas Frescal	0,977	0,981	0,980	0,979 (0,002)
Queijo Minas Artesanal	0,942	0,942	0,941	0,942 (0,001)
Queijo Minas Frescal	0,983	0,980	0,980	0,981 (0,001)
Queijo Serra da Canastra	0,829	0,827	0,823	0,826 (0,003)
Queijo Meia Cura	0,959	0,966	0,966	0,964 (0,003)
Queijo Coalho	0,944	0,941	0,940	0,942 (0,002)
Queijo Minas Artesanal	0,964	0,962	0,960	0,962 (0,002)
Queijo Minas Artesanal	0,962	0,962	0,962	0,962 (0,000)
Queijo Minas Frescal	0,978	0,979	0,979	0,979 (0,001)

Tabela 8: Resultado para análise de atividade de água (Aw) (continuação)

Amostra	1	2	3	Média (DP)
Queijo Minas Frescal	0,984	0,984	0,986	0,985 (0,001)
Queijo Minas Artesanal	0,954	0,955	0,955	0,955 (0,001)
Queijo Minas Artesanal	0,982	0,982	0,983	0,982 (0,001)
Ricota fresca	0,978	0,981	0,981	0,980 (0,001)
Queijo tipo Fontina	0,961	0,963	0,962	0,962 (0,001)
Ricota defumada	0,956	0,970	0,975	0,967 (0,008)
Queijo Minas Artesanal	0,952	0,954	0,954	0,953 (0,001)
Queijo Minas Frescal	0,990	0,990	0,990	0,990 (0,000)
Queijo Minas Artesanal	0,965	0,963	0,962	0,963 (0,001)
Queijo Minas Padrão	0,960	0,959	0,965	0,961 (0,003)
Queijo Minas Artesanal	0,941	0,940	0,937	0,939 (0,002)
Queijo Minas Artesanal	0,965	0,969	0,965	0,966 (0,002)
Queijo Minas Artesanal	0,945	0,943	0,946	0,945 (0,001)
Requeijão cremoso	0,982	0,980	0,983	0,982 (0,001)
Requeijão cremoso	0,982	0,978	0,980	0,980 (0,002)
Requeijão cremoso	0,978	0,981	0,982	0,980 (0,002)
Produto lácteo cremoso sabor requeijão	0,989	0,992	0,989	0,990 (0,001)
Produto lácteo cremoso sabor requeijão	0,988	0,987	0,989	0,988 (0,001)
Requeijão cremoso	0,990	0,987	0,986	0,988 (0,002)
Produto lácteo cremoso sabor requeijão	0,994	0,995	0,996	0,995 (0,001)
Produto lácteo cremoso sabor quatro queijos	0,994	0,991	0,990	0,992 (0,002)
Produto lácteo fundido	0,991	0,992	0,992	0,992 (0,001)
Requeijão cremoso	0,993	0,993	0,992	0,993 (0,001)
Composto lácteo em pó	0,313	0,292	0,284	0,296 (0,012)
Composto lácteo em pó	0,389	0,325	0,305	0,340 (0,036)
Leite em pó integral	0,297	0,311	0,305	0,304 (0,006)
Leite em pó integral	0,306	0,326	0,310	0,314 (0,009)
Leite em pó integral	0,292	0,285	0,277	0,285 (0,006)
Leite em pó integral	0,423	0,431	0,430	0,428 (0,004)
Composto lácteo em pó	0,321	0,330	0,328	0,326 (0,004)
Composto lácteo em pó	0,296	0,296	0,298	0,297 (0,001)
Composto lácteo em pó	0,293	0,291	0,300	0,295 (0,004)
Composto lácteo em pó	0,288	0,288	0,277	0,284 (0,005)

Tabela 8: Resultado para análise de atividade de água (Aw) (continuação)

Amostra	1	2	3	Média (DP)
Doce de base láctea	0,835	0,836	0,839	0,837 (0,002)
Doce de leite pastoso	0,806	0,805	0,812	0,808 (0,003)
Leite condensado	0,816	0,816	0,815	0,816 (0,001)
Leite condensado	0,850	0,849	0,847	0,849 (0,001)
Doce de base láctea	0,870	0,870	0,871	0,870 (0,001)
Doce de leite pastoso	0,821	0,824	0,823	0,823 (0,001)
Doce de base láctea	0,572	0,503	0,479	0,518 (0,039)
Doce de leite pastoso	0,856	0,854	0,855	0,855 (0,001)
Doce de leite pastoso	0,824	0,820	0,820	0,821 (0,002)
Doce de leite pastoso	0,826	0,827	0,824	0,826 (0,001)
Pó para o preparo de bebida de base láctea	0,267	0,264	0,249	0,260 (0,008)
Pó para o preparo de bebida de base láctea	0,362	0,355	0,372	0,363 (0,007)
Pó para o preparo de bebida de base láctea	0,328	0,316	0,325	0,323 (0,005)
Pó para o preparo de bebida de base láctea	0,338	0,323	0,311	0,324 (0,011)
Pó para o preparo de bebida de base láctea	0,539	0,541	0,547	0,542 (0,003)
Pó para o preparo de bebida de base láctea	0,353	0,364	0,364	0,360 (0,005)
Pó para o preparo de bebida de base láctea	0,366	0,376	0,379	0,374 (0,006)
Pó para o preparo de bebida de base láctea	0,335	0,336	0,331	0,334 (0,002)
Pó para o preparo de bebida de base láctea	0,298	0,289	0,294	0,294 (0,004)
Pó para o preparo de bebida de base láctea	0,336	0,328	0,331	0,332 (0,003)
Suplemento proteico em pó	0,367	0,345	0,338	0,350 (0,012)
Suplemento proteico em barra	0,622	0,623	0,620	0,622 (0,001)
Suplemento proteico em pó	0,377	0,360	0,361	0,366 (0,008)
Suplemento proteico em barra	0,543	0,547	0,572	0,554 (0,013)

Tabela 8: Resultado para análise de atividade de água (Aw) (continuação)

Amostra	1	2	3	Média (DP)
Suplemento proteico em barra	0,639	0,623	0,615	0,626 (0,010)
Suplemento proteico em barra	0,617	0,604	0,591	0,604 (0,011)
Suplemento proteico em barra	0,675	0,678	0,671	0,675 (0,003)
Suplemento proteico em barra	0,536	0,520	0,516	0,524 (0,009)
Suplemento proteico em barra	0,632	0,641	0,633	0,635 (0,004)
Suplemento proteico em barra	0,695	0,698	0,700	0,698 (0,002)

Staphylococcus aureus é uma bactéria que pode crescer em atividade de água de 0,83 a 0,99 (SILVA *et al.*, 2021). O crescimento ideal ocorre na faixa de atividade de água de 0,99 e as cepas em sua grande maioria são altamente tolerantes a sais e açúcares (FDA, 2012).

Atividade de água é um fator intrínseco importante para o desenvolvimento microbiano. A maioria das bactérias crescem em valores de atividade de água acima de 0,91, com exceções por exemplo, *S. aureus* consegue desenvolver até de 0,85, tendo seu crescimento já evidenciado na faixa de 0,83. (JUNIOR *et al.*, 2019).

De acordo com FORSYTHE (2013), os parâmetros para que ocorra a multiplicação de *S. aureus* são: atividade de água de 0,83 a 0,99, pH de 4 a 10 e temperatura de 7 a 48°C. Para a produção de enterotoxinas estafilocócicas os parâmetros são: faixa de atividade de água de 0,87 a 0,99, pH de 4,5 a 9,6 e temperatura de 10 a 48°C.

No estudo realizado foi detectada a presença de enterotoxina na amostra de produto lácteo fundido e na amostra de queijo Minas Artesanal, apresentando respectivamente os valores de atividade de água de 0,992 e 0,939. Estes valores se encontram dentro da faixa de condições ideais para produção de enterotoxina estafilocócica. Contudo na amostra de produto lácteo fundido não houve contagem de Estafilococos coagulase positiva. Na amostra de queijo Minas Artesanal a contagem de Estafilococos coagulase positiva foi 1×10^2 UFC/g, valor este considerado como limite de qualidade aceitável, dentro da legislação vigente.

5.4 ANÁLISE COM CEPA PRODUTORA DE ENTEROTOXINA

CHAVES (2014) realizou estudo para o levantamento da contaminação por linhagens de *Staphylococcus* em instalações de cozinhas e avaliação da capacidade de produção de enterotoxinas após inoculação em caldo BHI. Dos 57 isolados analisados, 6 apresentaram capacidade para produção de enterotoxina estafilocócica. Foi utilizado o protocolo de extração e o kit de detecção Vidas® SET2 da empresa Biomerieux. O autor, utilizando a linhagem de cepa produtora de enterotoxina A, ATCC 13565, também inoculou amostras de carne de frango esterilizadas a fim de avaliar tempo de produção de enterotoxina em variações dos parâmetros pH, concentração de sal e temperatura de armazenamento.

AL-NABULSI *et al.* (2020) avaliaram a produção de enterotoxina de quatro cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 1131, ATCC 1210, ATCC 25923 e ATCC 439) inoculadas em amostras de leite UHT no período de 28 dias. Utilizando o kit de detecção Vidas® SET2 da empresa Biomerieux, obtiveram como resultado apenas a produção pela cepa ATCC 439 na amostra de leite UHT, porém no teste onde foi realizada inoculação desta mesma cepa em queijo tipo Feta, não houve a detecção de produção de enterotoxina.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, foram selecionadas cepas de *S. aureus* para inoculação em amostras de alimento e de caldo BHI para verificar a produção de enterotoxinas. De igual forma foi realizada a padronização da suspensão e diluição do inóculo para concentração final de 10^4 UFC/g, porém diferente do resultado obtido por CHAVES (2014) não foi detectada a produção de enterotoxina.

As amostras avaliadas apresentaram resultado negativo para a presença de enterotoxina. As cepas inoculadas não produziram a enterotoxina esperada.

As cepas embora estivessem em um ambiente propício para seu desenvolvimento e multiplicação, não produziram a enterotoxina desejada para detecção pelo equipamento MiniVidas®, houve apenas a multiplicação celular sem a produção de enterotoxina.

Embora a cepa CCT 0676 proveniente da Fundação André Tosello, fosse classificada como produtora de enterotoxina A (SEA) e utilizada como tipo para ensaios de enterotoxina estafilocócica (Fundação André Tosello, 2021), a mesma

não produziu enterotoxina no teste de inoculação e contaminação artificial das amostras.

5.5 DESEMPENHO DO KIT DE DETECÇÃO – ENTEROTOXINA PURIFICADA

Foram preparadas soluções padrões de valores estabelecidos de enterotoxina estafilocócica por ml, para a realização das análises.

Os testes foram iniciados, aplicando diretamente no barrete do kit de detecção Vidas® SET2, as soluções preparadas. Obteve-se os seguintes valores:

- Teste 1: 0,5ml da solução de enterotoxina na concentração de 500ng/ml, aplicada direto no barrete: resultado Positivo e VT: 2,92;
- Teste 2: 0,5ml da solução de enterotoxina na concentração de 500ng/ml, aplicada direto no barrete: resultado Positivo e VT: 2,89;
- Teste 3: 0,5ml da solução de enterotoxina na concentração de 2ng/ml, aplicada direto no barrete: resultado Positivo e VT: 0,21;
- Teste 4: 0,5ml da solução de enterotoxina na concentração de 2ng/ml, aplicada direto no barrete: resultado Positivo e VT: 0,15.

Considerando as concentrações utilizadas e o volume acondicionado no barrete para análise e leitura, identificou-se que o equipamento foi capaz de detectar 1ng da enterotoxina em 0,5ml de solução.

Foram realizados testes aplicando a solução de enterotoxina na concentração de 500ng/ml, nas matrizes de queijo e leite, obtendo-se os seguintes valores:

- Teste 5: 0,05ml da solução adicionada em 25g de queijo: resultado Negativo e VT: 0,01;
- Teste 6: 0,05ml da solução adicionada em 25g de queijo: resultado Negativo e VT: 0,01;
- Teste 7: 0,75ml da solução adicionada em 25g de queijo: resultado Negativo e VT: 0,08;
- Teste 8: 0,75ml da solução adicionado em 25 ml de leite: resultado Negativo e VT: 0,11;
- Teste 9: 0,05ml da solução adicionado em 25 ml de leite: resultado Negativo e VT: 0,01;

- Teste 10: 0,05ml da solução adicionado em 25 ml de leite: resultado Negativo e VT: 0,01.

O leite e queijo utilizados como amostra são matrizes que diferem muito entre si, sendo o queijo uma matriz muito mais complexa, porém de acordo com os resultados obtidos não houve diferença significativa entre eles no processo de extração e recuperação da enterotoxina.

Com relação a recuperação da enterotoxina, quando comparado com os valores obtidos da avaliação das soluções padrão preparadas e aplicadas diretamente no barrete, identificou-se que ocorre perdas durante o processo de extração, pois os valores de VT obtidos das amostras de leite e queijo inoculadas com as soluções preparadas, ficaram abaixo do esperado.

5.6 TABELA COMPARATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS NAS ANÁLISES

Para melhor visualização e comparação dos resultados obtidos nas análises contagem de *Estafilococos* coagulase positiva, atividade de água e detecção da enterotoxina estafilocócica, a tabela 9 apresenta os resultados de todas as amostras avaliadas.

Tabela 9: Resultados para análise de contagem de *Estafilococos* coagulase positiva, atividade de água (Aw) e detecção de enterotoxina estafilocócica.

Amostra	UFC/g	Aw	Enterotoxina e VT
1 - Queijo Minas Frescal	$3,5 \times 10^7$	0,976	negativo: VT 0,00
2 - Queijo Minas Frescal	$9,7 \times 10^6$	0,977	negativo: VT 0,00
3 - Queijo Minas Frescal	$<10^2$	0,981	negativo: VT 0,00
4 - Queijo Minas Frescal	$4,1 \times 10^6$	0,980	negativo: VT 0,00
5 - Queijo Minas Frescal	$6,6 \times 10^7$	0,971	negativo: VT 0,00
6 - Queijo Minas Frescal	$<10^2$	0,977	negativo: VT 0,00
7 - Queijo Frescal de Soro de Leite	$<10^2$	0,980	negativo: VT 0,00
8 - Queijo Minas Frescal	$<10^2$	0,978	negativo: VT 0,00
9 - Queijo Minas Frescal	$<10^2$	0,979	negativo: VT 0,07
10 - Queijo Minas Artesanal	$<10^2$	0,942	negativo: VT 0,01

Tabela 9: Resultados para análise de contagem de *Estafilococos coagulase positiva*, atividade de água (Aw) e detecção de enterotoxina estafilocócica (continuação)

Amostra	UFC/g	Aw	Enterotoxina e VT
11 - Queijo Minas Frescal	<10 ²	0,981	negativo: VT 0,00
12 - Queijo Serra da Canastra	<10 ²	0,826	negativo: VT 0,00
13 - Queijo Meia Cura	1,1x10 ⁷	0,964	negativo: VT 0,00
14 - Queijo Coalho	<10 ²	0,942	negativo: VT 0,00
15 - Queijo Minas Artesanal	<10 ²	0,962	negativo: VT 0,00
16 - Queijo Minas Artesanal	<10 ²	0,962	negativo: VT 0,01
17 - Queijo Minas Frescal	<10 ²	0,979	negativo: VT 0,00
18 - Queijo Minas Frescal	<10 ²	0,985	negativo: VT 0,00
19 - Queijo Minas Artesanal	<10 ²	0,955	negativo: VT 0,01
20 - Queijo Minas Artesanal	<10 ²	0,982	negativo: VT 0,00
21 - Ricota fresca	<10 ²	0,980	negativo: VT 0,00
22 - Queijo tipo Fontina	<10 ²	0,962	negativo: VT 0,00
23 - Ricota defumada	<10 ²	0,967	negativo: VT 0,00
24 - Queijo Minas Artesanal	<10 ²	0,953	negativo: VT 0,12
25 - Queijo Minas Frescal	<10 ²	0,990	negativo: VT 0,00
26 - Queijo Minas Artesanal	<10 ²	0,963	negativo: VT 0,01
27 - Queijo Minas Padrão	<10 ²	0,961	negativo: VT 0,00
28 - Queijo Minas Artesanal	1,0x10 ²	0,939	POSITIVO: VT 0,13
29 - Queijo Minas Artesanal	<10 ²	0,966	negativo: VT 0,01
30 - Queijo Minas Artesanal	3,9x10 ⁶	0,945	negativo: VT 0,05
1 - Requeijão cremoso	<10 ²	0,982	negativo: VT 0,01
2 - Requeijão cremoso	<10 ²	0,980	negativo: VT 0,00
3 - Requeijão cremoso	<10 ²	0,980	negativo: VT 0,10
4 - Produto lácteo cremoso sabor requeijão	<10 ²	0,990	negativo: VT 0,00
5 - Produto lácteo cremoso sabor requeijão	<10 ²	0,988	negativo: VT 0,02
6 - Requeijão cremoso	<10 ²	0,988	negativo: VT 0,01
7 - Produto lácteo cremoso sabor requeijão	<10 ²	0,995	negativo: VT 0,00

Tabela 9: Resultados para análise de contagem de Estafilococos coagulase positiva, atividade de água (Aw) e detecção de enterotoxina estafilocócica (continuação)

Amostra	UFC/g	Aw	Enterotoxina e VT
8 - Produto lácteo cremoso sabor 4 queijos	<10 ²	0,992	negativo: VT 0,00
9 - Produto lácteo fundido	<10 ²	0,992	POSITIVO: VT 0,19
10 - Requeijão cremoso	<10 ²	0,993	negativo: VT 0,04
1 - Composto lácteo em pó	<10 ²	0,296	negativo: VT 0,00
2 - Composto lácteo em pó	<10 ²	0,340	Negativo: VT 0,00
3 - Leite em pó integral	<10 ²	0,304	negativo: VT 0,00
4 - Leite em pó integral	<10 ²	0,314	negativo: VT 0,00
5 - Leite em pó integral	<10 ²	0,285	negativo: VT 0,00
6 - Leite em pó integral	<10 ²	0,428	negativo: VT 0,00
7 - Composto lácteo em pó	<10 ²	0,326	negativo: VT 0,00
8 - Composto lácteo em pó	<10 ²	0,297	negativo: VT 0,01
9 - Composto lácteo em pó	<10 ²	0,295	negativo: VT 0,01
10 - Composto lácteo em pó	<10 ²	0,284	negativo: VT 0,00
1 - Doce de base láctea	<10 ²	0,837	negativo: VT 0,00
2 - Doce de leite pastoso	<10 ²	0,808	negativo: VT 0,00
3 - Leite condensado	<10 ²	0,816	negativo: VT 0,00
4 - Leite condensado	<10 ²	0,849	negativo: VT 0,00
5 - Doce de base láctea	<10 ²	0,870	negativo: VT 0,01
6 - Doce de leite pastoso	<10 ²	0,823	negativo: VT 0,00
7 - Doce de base láctea	<10 ²	0,518	negativo: VT 0,00
8 - Doce de Leite pastoso	<10 ²	0,855	negativo: VT 0,00
9 - Doce de Leite pastoso	<10 ²	0,821	negativo: VT 0,00
10 - Doce de Leite pastoso	<10 ²	0,826	negativo: VT 0,01
1 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²	0,260	negativo: VT 0,00
2 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²	0,363	negativo: VT 0,00
3 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²	0,323	negativo: VT 0,00
4 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²	0,324	negativo: VT 0,00

Tabela 9: Resultados para análise de contagem de Estafilococos coagulase positiva, atividade de água (Aw) e detecção de enterotoxina estafilocócica (continuação)

Amostra	UFC/g	Aw	Enterotoxina e VT
5 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²	0,542	negativo: VT 0,06
6 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²	0,360	negativo: VT 0,00
7 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²	0,374	negativo: VT 0,00
8 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²	0,334	negativo: VT 0,00
9 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²	0,294	negativo: VT 0,00
10 - Pó para o preparo de bebida de base láctea	<10 ²	0,332	negativo: VT 0,00
1 - Suplemento proteico em pó	<10 ²	0,350	negativo: VT 0,00
2 - Suplemento proteico em barra	<10 ²	0,622	negativo: VT 0,00
3 - Suplemento proteico em pó	<10 ²	0,366	negativo: VT 0,00
4 - Suplemento proteico em barra	<10 ²	0,554	negativo: VT 0,00
5 - Suplemento proteico em barra	<10 ²	0,626	negativo: VT 0,00
6 - Suplemento proteico em barra	<10 ²	0,604	negativo: VT 0,00
7 - Suplemento proteico em barra	<10 ²	0,675	negativo: VT 0,00
8 - Suplemento proteico em barra	<10 ²	0,524	negativo: VT 0,00
9 - Suplemento proteico em barra	<10 ²	0,635	negativo: VT 0,00
10 - Suplemento proteico em barra	<10 ²	0,698	negativo: VT 0,00

6. CONCLUSÕES

De acordo com a legislação vigente (RDC 724/22 e IN 161/22) são estabelecidos os limites microbiológicos para detecção para *Estafilococos coagulase positiva* em diversas categorias de alimentos. As amostras de queijo analisadas neste estudo, que foram detectadas como *Estafilococos coagulase positiva*, apresentaram contagem acima do estabelecido em lei para qualidade aceitável, o que evidenciou falhas de controle de qualidade pelos fabricantes.

A amostra de queijo Minas Artesanal na qual foi detectada a presença de enterotoxina estafilocócica, apresentou valor para contagem de $1,0 \times 10^2$ UFC/g, valor dentro do limite para qualidade aceitável de acordo com a legislação.

S. aureus é um microrganismo que não resiste ao tratamento térmico, porém suas toxinas podem permanecer do alimento, o que levanta a possibilidade da contaminação e produção de enterotoxinas nesta amostra de queijo ser proveniente da matéria prima utilizada.

A amostra de produto lácteo fundido não exprimi resultado para contagem de *Estafilococos coagulase positiva*, porém foi detectada como positiva para a presença de enterotoxina, isso exemplifica a importância de a nova legislação exigir este tipo de análise para determinadas categorias de alimentos susceptíveis a este tipo de contaminação, além da realização de análise para detectar a contagem de *Estafilococos coagulase positiva*.

Atividade de água é um importante parâmetro que avalia a disponibilidade de água no alimento, e para a produção de enterotoxinas estafilocócicas deve estar na faixa de 0,87 a 0,99. Dentre as 80 amostras analisadas, 50% delas apresentaram-se dentro desta faixa, incluindo as duas amostras detectadas como positivas para a presença da enterotoxina. A atividade de água influencia na produção das enterotoxinas, portanto nas amostras que estavam abaixo deste valor não seria possível a multiplicação celular com produção de enterotoxinas, porém poderiam apresentar resultado positivo caso a mesma já estivesse presente no início, na matéria prima utilizada para formulação destes alimentos.

Com relação ao método de imunoensaio baseado no método ELFA e uso do kit de detecção Vidas® SET2 e o equipamento MiniVidas® da empresa Biomerieux, verificou-se que este se mostrou de fácil uso de aplicação, viável na

rotina do laboratorial e de resultado rápido (80 minutos após extração e adição da amostra no equipamento).

Embora o percentual de amostras detectadas como positivo para a presença de enterotoxinas estafilocócicas (2,5%) possa ser considerado baixo, este estudo foi importante para apresentar que atualmente há alimentos que contem enterotoxinas estafilocócicas, mesmo estando dentro do limite ou ausentes para a presença de *Estafilococos* coagulase positiva. A presença destes alimentos disponíveis no mercado varejista acessíveis ao consumidor final, apresentam um risco a saúde da população, devido a possibilidade de causar doenças transmitidas por alimentos e surtos alimentares.

7. REFERÊNCIAS

AHMED, M. Y. *et al.* Molecular Detection of Staphylococcal Enterotoxins and *mecA* Genes Products in Selected Food Samples Collected from Different Areas in Khartoum State. **International Journal of Microbiology**. v. 2021, Article ID 5520573, p 1-9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/5520573>. Acesso em: 9 fev. 2023.

Al-Nabulsi, A. A. *et al.* Factors affecting the viability of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin during processing and storage of white-brined cheese. **Journal of Dairy Science**. vol. 103, issue 8. p. 6869-6881. 2020.

ALVES, V. F. *et al.* Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* from some artisanal Brazilian dairies. **International Dairy Journal**, v.85, p. 247-253, out. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.008>. Acesso em: 26 mai. 2020.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos: normas estabelecem padrões microbiológicos. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/alimentos-normas-estabelecem-padroes-microbiologicos/219201/pop_up. Acesso em: 20 mar. 2020.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa – IN nº60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n.249, p. 133-139, 26 dez. 2019. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=26/12/2019&jornal=515&pagina=133&totalArquivos=149>. Acesso em: 17 mar. 2020.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº331, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n.249, p. 96-97, 26 dez. 2019. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=26/12/2019&jornal=515&pagina=96&totalArquivos=149>. Acesso em: 17 mar. 2020.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Perguntas & Respostas Padrões Microbiológicos. 2.Ed. Brasília, jul. 2020. 65 p.

ARAGON-ALEGRO, L.C. *et al.* Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. **Food Control**. Oxford: Elsevier B.V., v. 18, n. 6, p. 630-634, jun. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.02.010>. Acesso em 26 mai. 2020.

ARGUDIN, M. Á.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2(7), p. 1751-1773, jul, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins2071751>. Acesso em: 20 set. 2020.

BAER. E. F. *et al.* Method for the enumeration of *Staphylococcus aureus*. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 2 ed. Washington: APHA, p. 374 – 386. 1976

BAO, K.D.; LETELLIER, A.; BEAUDRY, F. Analysis of *Staphylococcus* enterotoxin B using differential isotopic tags and liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry. **Biomedical Chromatography** 26, p. 1049–1057. 2012

BENNETT R. W. Staphylococcal Enterotoxin and Its Rapid Identification in Foods by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay–Based Methodology. **Journal of Food Protection**, v. 68, nº 6, pp. 1264–1270, 2005. Disponível em: http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/68/6/1264/1676756/0362-028x-68_6_1264.pdf. Acesso em: 17 Mai 2020.

BRASIL. Exército. Estado-Maior. **Manual de Campanha. Defesa Química, Biológica, Radiológica e Nuclear**. EB70-MC-10.233. 1.ed. Brasília, DF: EME, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2018. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>. Acesso em 29 out. 2020

BRASIL. Ministério da Saúde, 2020. **Doenças transmitidas por alimentos, Informações técnicas**. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos/informacoes-tecnicas>. Acesso em: 22 mai. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2022. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil, Informe 2022**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2022/view>. Acesso em 23 jan. 2023

B.V., LabMakelaar Benelux. **Biomérieux Mini Vidas Immuno Analyzer**. Disponível em: <https://www.labmakelaar.eu/shop/all/saleable/clinical-and-chemical-analysis/clinical-analyzers/biomerieux-mini-vidas-immuno-analyzer/>. Acesso em: 15 set. 2022.

BIOMERIEUX (Brasil). **VIDAS® SET 2**: Sistema de detecção automática de patógenos alimentares. 2022. Disponível em: <https://www.biomerieux.com.br/recursos/vidasr-set-2>. Acesso em: 15 set. 2022.

BORGES, M. F. et al. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitoramento das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**. vol. 38. p. 1431 – 1438. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000500037>. Acesso em: 29 mai. 2023

CAMPOS, F. M. et al. Presence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxin A Production and Inactivation in Brazilian Cheese Bread. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.65: e22200564, ISSN 1678-4324, 2022 Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2022200564>. Acesso em: 29 jan. 2023.

CAVICCHIOLI V.Q. et al. Occurrence of Salmonella, Listeria monocytogenes, and enterotoxigenic Staphylococcus in goat milk from small and medium-sized farms located in Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.12, p. 8386-8390, dez. 2015 Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9733>. Acesso em: 26 mai. 2020.

CDC – Centers For Disease Control and Prevention (EUA). National Outbreak Reporting System (NORS). 2022. Disponível em: <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>. Acesso em: 19 jul. 2023.

CDC – Centers For Disease Control and Prevention (EUA). Staphylococcal (Staph) Food Poisoning. 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/staphylococcal.html>. Acesso em: 8 fev. 2023.

CHAVES, R. D. **Levantamento da contaminação por linhagens de Staphylococcus em instalações de cozinhas, avaliação da capacidade de produção de enterotoxina estafilocócicas (SE). Modelagem preditiva do tempo para produção e quantificação da expressão dos genes codificadores de SE.** 2014. 117 f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2014.

CORTEZI, A. M. **Condições higiênico-sanitárias e de manejo de rebanhos leiteiros correlacionados à qualidade do leite cru refrigerado.** 2014. 68 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2014.

DECAGON DEVICES, Inc. AquaLab, Water Activity Meter. **Manual de Operação**, versão 6. Disponível em: http://library.metergroup.com/Retired%20and%20Discontinued/Manuals/10607_AquaLab%20Series%203%20and%203TE_Web.pdf. Acesso em: 15 set. 2022

DIAB, M.S. *et al.* Molecular detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin genes isolated from mastitic milk and humans in El-Behira, Egypt. **International Journal of One Health**, v.7, n.1, EISSN:2455-8931, p. 70-77, 2021. Disponível em: <https://www.onehealthjournal.org/Vol.7/No.1/9.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2023.

DITTMANN, K. K. *et al.* *Staphylococcus aureus* in some brazilian dairy industries: changes of contamination and diversity. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-12, 24 out. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02049>. Acesso em: 26 mai. 2020.

FDA – Food and Drug Administration. **Bad Bug Book**, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. 2. ed. Chapter *Staphylococcus aureus*, p. 87-91. 2012. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/83271/download>. Acesso em: 28 abr. 2020.

FDA – Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual (BAM)**. Chapter 13B – Staphylococcal Enterotoxins Detection Methods. Revision History: September 2022. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-13b-staphylococcal-enterotoxins-detection-methods>. Acesso em 10 out. 2022.

FISHER, Emilie L.; OTTO, Michael; CHEUNG, Gordon Y. C. Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated Staphylococcal Food Poisoning. **Frontiers In Microbiology**. v 9, p. 1-18, 13 mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00436>. Acesso em: 7 fev. 2023.

FRANCO, B. D.G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 182p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ª ed., Porto Alegre: ARTMED, 2013. 606p.

FURLANETTO, S. M. P. et al. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos a partir de leite de vacas mastísticas. **Revista de Microbiologia**, vol. 18 nº2, p. 138 -143.1987

GILLASPY, A.F.; IANDOLO, J.J. *Staphylococcus*. **Encyclopedia of Microbiology**; 3 ed., p. 293–303, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00237-6>. Acesso em: 23 mar. 2023.

HAIT, J. et al. *Staphylococcus aureus* Outbreak Investigation of an Illinois Bakery. **Journal of Food Safety**.v.32, p. 435-444, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfs.12002>. Acesso em: 10 nov. 2020.

HALL, H.E.; ANGELOTTI, R.; LEWIS, K.H. Quantitative detection of Staphylococcal enterotoxin B in food by gel-diffusion methods. **Public Health Rep**. 78, 1089, 1963

ICMSF - INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS et al, (org.). **Microrganismos em alimentos 8**: Utilização de dados para avaliação do controle de processo e aceitação de produto. 2º. ed. São Paulo: Blucher, 2018. 536 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6888-1**: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium, 1º ed., 1999. Amendment 1:2003, *Amendment 2:2018*.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 19020:2017**: Microbiology of the food chain — Horizontal method for the immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins in foodstuffs, 1st ed., 2017.

JOHLER, S. *et al.* Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Due to SEA-Producing *Staphylococcus aureus*. **Foodborne pathogens and disease**. v.10, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1503>. Acesso em: 10 nov. 2020.

JUNIOR, F. P. A. *et al.* Fatores que propiciam o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em alimentos e riscos atrelados a contaminação: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v.18, n.1, p. 89-93. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.9771/cmbio.v18i1.25215>. Acesso em: 20 mai. 2023.

KNOWLES, M.E.*et al.* **Present Knowledge in Food Safety**. Chapter 30 - Dairy production: microbial safety of raw milk and processed milk products. p. 439 – 454. 2022.

LABBÉ, G. R.; GARCIA, S. **Guide to foodborne pathogens**. 2. ed. Wiley Blackwell, 2013. 488 p.

LEE, C.L.; LIN, C.C. Detection of Staphylococcal enterotoxin by latex agglutination inhibition test. **Chin. J. Microbiol. Immunol.** 17, 77–80. 1984

MURATOVIC, A. Z. *et al.* Quantitative analysis of Staphylococcal enterotoxins A and B in food matrices using ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Toxins**. 7, p.3637–3656. 2015

NECIDOVA, L. *et al.* Effect of heat treatment on activity of staphylococcal enterotoxins of type A, B, and C in milk. **Journal of Dairy Science**, v.102, n.05, p. 3924-3932, mai. 2019 Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15255>. Acesso em: 2 fev. 2023.

PARTE, A.C. *et al.*, 2020. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 70, 5607-5612; Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/genus/staphylococcus>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2023.

PINCHUK, I. V.; BESWICK E. J.; REYES. V. E. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins**, v. 2(8), p. 2177-2197, ago. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins2082177>. Acesso em: 24 mai. 2020.

QUINN, P. J. *et al.* **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1. Ed. – São Paulo: Editora Artimed, 2005. 512 p.

READ, R.B. *et al.* Assay of Staphylococcal enterotoxin from cheese. **J. Dairy Sci.** 48, 420–424. 1965

SANTANA, E. H. W. *et al.* Estafilococos em alimentos. **Arquivo Instituto Biológico**, v 77, n.3, p 545-554, São Paulo. 2010.

SALOMON, L.L.; TEW, R.W. Assay of Staphylococcal enterotoxin B by latex agglutination. **Exp. Biol. Med.** 129, 539–542, 1968

SILVA, J. C. S. **Estudo biotecnológico de leite de cabras e seu ambiente de produção no sertão de Alagoas**. 2011. 144 f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2011.

SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 6. Ed. – São Paulo: Blucher, 2021. 602p.

SILVA, C. B. *et al.* Microbiological quality and cultivable bacterial community of fresh and ripened Minas cheeses made from raw and pasteurised milk. **International Dairy Journal**, v.143, 105662, abr. 2023 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105662>. Acesso em: 19 mai. 2023.

SILVA, M. P. *et al.* Presence and growth prediction of *Staphylococcus* spp. and *Staphylococcus aureus* in Minas Frescal cheese, a soft fresh cheese produced in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v.104, n.12, p. 12312-12320, dez. 2021 Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20633>. Acesso em: 18 mai. 2023.

SOBRAL, M. M. A. **Biopreparação – Microrganismos Passíveis de Serem Utilizados como Armas Biológicas**. 2017. 94 f. Dissertação – Universidade

Lusófona de Humanidades e Tecnologias – Faculdade de Ciências e Tecnologias de Saúde, Lisboa, 2017.

SOSPEDRA, I. *et al.* Rapid whole protein quantitation of Staphylococcal enterotoxins A and B by liquid chromatography/mass spectrometry. **J. Chromatography A**. 1238, p. 54–59. 2012

TOSELLO, Fundação André (org). **Catálogo de Culturas**. 2021. Fundação André Tosello. Disponível em: [https://fat.org.br/catalogo-de-culturas-online/?termo=enterotoxin &letra](https://fat.org.br/catalogo-de-culturas-online/?termo=enterotoxin&letra). Acesso em: 14 jul. 2021.

VASCONCELOS, N. G.; CUNHA, M. L. R. S. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. **Journal of Public Health and Epidemiology**. v. 2(3), p 29-42, jun. 2010. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/137217/ISSN2141-2316-2010-02-03-29-42.pdf?sequence=1>. Acesso em: 5 fev. 2023.

VERNOZY-ROZAND, C. *et al.* Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. **Letters in Applied Microbiology**, 39, p.490-494, dez. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01602.x>. Acesso em: 24 mai. 2020.

VINHA, M. B.; PINTO, C. L. O.; CHAVES, J. B. P. Estafilococos coagulase positiva em queijos Minas Frescal produzidos em agroindústrias familiares. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, vol. 73, nº2, p. 62-72. 2018 Disponível em: <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v73i2.656>. Acesso em 28 mai. 2023.

WENDPAP, L. L.; ROSA, O. O. Presença de *Staphylococcus aureus* em queijos Minas consumido no município de Cuiabá, MT. **Revista Higiene Alimentar**, vol. 7 nº 27, p. 23 – 29 .1993

WU, S. *et al.* A review of the methods for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins, **Toxins**, p.1-20, 2016. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/toxins8070176>. Acesso em: 27 mai.2020