



RAFAEL DJALMA CHAVES

**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**

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RAFAEL DJALMA CHAVES

**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**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para obtenção do título de
Doutor em Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Pereira
Co orientadora: Dra. Alessandra Regina da Silva Marques

Este exemplar corresponde à versão final da
tese defendida pelo aluno Rafael Djalma Chaves
e orientada pelo Prof. Dr. José Luiz Pereira

Assinatura do orientador

Campinas - SP
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

C398L Chaves, Rafael Djalma, 1980-
Levantamento da contaminação por linhagens de *Staphylococcus* em instalações de cozinhas, avaliação da capacidade de produção de enterotoxinas estafilocócicas (se), modelagem preditiva do tempo para produção e quantificação da expressão dos genes codificadores de se / Rafael Djalma Chaves. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: José Luiz Pereira.

Coorientador: Alessandra Regina da Silva Marques.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Staphylococcus*. 2. Microbiologia. 3. Contaminação. 4. Reação em cadeia da polimerase. I. Pereira, José Luiz. II. Marques, Alessandra Regina da Silva. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Survey of contamination by *Staphylococcus* strains in kitchens premises, assessment of staphylococcal enterotoxin (SE) production, predictive modelling to forecast production and quantification of encoding SE genes expression.

Palavras-chave em inglês:

Staphylococcus

Microbiology

Contamination

Polymerase chain reaction

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

José Luiz Pereira [Orientador]

Anderson de Souza Sant'Ana

Dirce Yorika Kabuku

Maristela da Silva do Nascimento

Salatir Rodrigues Júnior

Data de defesa: 11-04-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz Pereira
Faculdade de Engenharia de Alimentos, FEA, UNICAMP
Orientador

Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana
Faculdade de Engenharia de Alimentos, FEA, UNICAMP
Membro

Prof^a. Dr^a. Dirce Yorika Kabuki
Faculdade de Engenharia de Alimentos, FEA, UNICAMP
Membro

Dr^a. Maristela da Silva do Nascimento
Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL
Membro

Prof. Dr. Salatir Rodrigues Júnior
Instituto Federal de Educação
Membro

Dr^a. Ana Carolina Bortolossi Rezende
Faculdade de Engenharia de Alimentos, FEA, UNICAMP
Suplente

Dr^a. Pilar Rodriguez de Massaguer
LABTERMO
Suplente

Prof. Dr. Wilmer Edgard Luera Peña
Centro de Ciências Agrárias, UFES
Suplente

À minha família e amigos, dedico.

“And you can tell everybody this is your song.”
(Elton John)

“Be not afraid of greatness.”
(William Shakespeare)

*“If you only knew what the future holds, after a hurricane, comes a rainbow. Maybe a reason
why, all the doors are closed, so you could open one that leads you to the perfect road.”*
(Katty Perry)

“I close my eyes only for a moment and the moment's gone.”
(Kerry Livgren)

*“As if time had stopped still I was numb with fear
But still I wanted to go
And the blaze of the fire did no hurt upon me
As I walked onto the coals”*
(Steve Harris/Bruce Dickinson)

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer meus pais e minha irmã, que mesmo não sabendo direito com o que trabalho, sempre me deram força e motivação para seguir em frente. Pois todo meu esforço é sempre pensando em vocês, e espero ainda poder dar muito orgulho.

Gostaria de agradecer ao Prof. José Luiz, por há 4 anos atrás ter me aceitado como orientado nesta empreitada, mesmo sabendo que o caminho seria tortuoso. Agradeço também a Profa. Pilar, a pessoa que me abriu as portas da FEA quando me aceitou, no longínquo ano de 2007 como aluno de mestrado. Obrigado mestres!

Agradeço aos professores membros da banca de defesa, tanto os membros titulares como os suplentes. Suas contribuições e sugestões tornaram meu trabalho muito melhor!

Aos amigos que fiz durante minha passagem pela FEA, às pessoas mais que queridas que trabalharam comigo no laboratório de Toxinas Microbianas, Norma, Dona Laura e Ju Carusi, muito obrigado pela ajuda mas principalmente pelo carinho e amizade!

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, Marcão e Cosme, obrigado pela paciência comigo nesta reta final! Ao Marquinhos, a pessoa que me deu a notícia quando passei no doutorado. Agradeço também às funcionárias da secretaria de Graduação, Jardete e Guiomar, obrigado pela ajuda ao longo dos anos!

Aos amigos da faculdade, muitos deles amigos desde a época de graduação, obrigado por todos esses anos de companheirismo. Obrigado Marcão, Alessandro, Julia, Verônica, Brédão, Santoro, Garden, Jorge, Shin, Bitá, Zapa, Sabin, Lula, Fipo, Banana, Guilhermino, Liuliu, Lauro, Pedro, Bera, Feno, Marcelinho, Emerson...provavelmente devo ter esquecido alguns nomes. Mas isso é bom sinal pois mostra que consegui cativar muitas amizades. Obrigado!

Gostaria de agradecer ao CNPq por ter financiado esta pesquisa através da bolsa concedida.

E finalmente, gostaria de agradecer a Dra. Alessandra Regina da Silva. Sem dúvida, a pessoa mais importante em todos esses meus anos de Engenharia de Alimentos. Sempre me orientando e me ajudando, desde a época do mestrado. Obrigado pela companhia, pela amizade e pelo privilégio de ter te conhecido. Obrigado por ter aceitado o desafio de me apresentar ao mundo da microbiologia preditiva, área na qual quero seguir minha carreira. Sem você, Alessandra, eu jamais chegaria onde estou chegando hoje. Espero que um dia nossos caminhos voltem a se cruzar. Eternamente obrigado!

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Revisão.....	1
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	5
3. Revisão bibliográfica.....	6
3.1. <i>Staphylococcus</i> e suas enterotoxinas.....	6
3.2. Caracterização e identificação de <i>Staphylococcus</i> spp. e suas enterotoxinas.....	9
3.3. Testes adicionais.....	10
3.3.1. Susceptibilidade à Furazolidona.....	11
3.3.2. Coagulase.....	11
3.3.3. Termonuclease.....	12
3.3.4. Identificação em nível de espécie.....	13
3.4. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas.....	15
3.5. Fontes de contaminação.....	18
3.6. Contaminação ambiental vs segurança alimentar.....	20
3.7. Microbiologia Preditiva.....	23
3.7.1. Clássica – histórico e definições.....	23
3.7.2. Níveis de modelo.....	27
3.7.3. Microbiologia preditiva moderna.....	29
4. Referências do capítulo 1.....	30
Capítulo 2 – Ocorrência de <i>Staphylococcus</i> em alimentos e em superfícies de instalações de cozinhas de creches e residenciais, e avaliação de seu potencial para produção de enterotoxinas.....	38
Resumo.....	39
1. Introdução.....	41
2. Material e métodos.....	42
2.1. Coleta de amostras.....	42
2.2. Enumeração de <i>Staphylococcus</i>	43
2.3. Detecção de <i>Staphylococcus</i>	43
2.4. Confirmação e identificação de <i>Staphylococcus</i>	43
2.5. Avaliação da produção de enterotoxinas.....	44
2.6. Análise de resultados.....	44
3. Resultados.....	44
3.1. Creches.....	44
3.2. Cozinhas residenciais.....	49
3.3. Sobremesas.....	50
3.4. Produção de enterotoxinas.....	51
4. Discussão.....	51
5. Agradecimentos.....	54
6. Referências do capítulo 2.....	54
Capítulo 3 – Modelagem secundária do tempo de detecção de Enterotoxina Estafilocócica A (SEA) em carne de frango em função de temperatura e concentração de sal.....	57
Resumo.....	58

1. Introdução.....	59
2. Material e métodos.....	60
2.1. Inóculo.....	60
2.2. Preparo das amostras.....	61
2.3. Desenho experimental.....	61
2.4. Análise de dados.....	63
2.5. Verificação biológica.....	65
3. Resultados.....	65
3.1. Influência das variáveis sobre o TPT.....	65
4. Discussão.....	76
5. Agradecimentos.....	78
6. Referências do capítulo 3.....	79
Capítulo 4 – Expressão de genes codificadores para Enterotoxinas Estafilocócicas (SE) em cepas recuperadas de instalações de cozinhas institucionais da cidade de Campinas, SP, Brasil.....	82
Resumo.....	83
1. Introdução.....	85
2. Material e métodos.....	86
2.1. Isolados.....	86
2.2. PCR quantitativo.....	86
3. Resultados.....	87
4. Discussão.....	91
5. Agradecimentos.....	93
6. Referências do capítulo 4.....	93
Capítulo 5 – Considerações finais.....	96
Apêndice 1.....	98
Apêndice 2.....	100
Anexo 1.....	111

RESUMO

Segundo o Ministério da Saúde (2013), no Brasil, de 2000 a 2013 foram notificados 8,857 surtos de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA), envolvendo mais de 163,000 doentes e pelo menos 112 óbitos (Brasil, 2013). Os agentes mais frequentes nos surtos são, em primeiro lugar, a *Salmonella* spp. (aprox. 40%) e em seguida *Staphylococcus* spp. (aprox. 20%), sendo as crianças de até 4 anos as mais susceptíveis. Neste cenário, as instituições de ensino representam o terceiro local de maior ocorrência das DVAs (8%), atrás de residências (40%) e restaurantes (15%). A assepsia dos manipuladores e superfícies de contato com alimentos (SCA) são de extrema importância no controle e distribuição de patógenos. Além do nível de contaminação por *Staphylococcus* spp., é importante o conhecimento de sua capacidade de produção de enterotoxinas e como a sua produção varia em função de mudanças em condições ambientais. Sendo assim, esta pesquisa teve como objetivos estabelecer o perfil de contaminação por *Staphylococcus* produtores de enterotoxinas em cozinhas institucionais (creches) e cozinhas residenciais, além de estabelecer um modelo matemático que descreva os limites críticos para produção de toxinas. Para tanto, foram realizadas coletas em pontos específicos dentro da área de manipulação de 4 cozinhas institucionais e 10 cozinhas residenciais, localizadas na cidade de Campinas, SP (utensílios, tábuas de corte, pias, maçanetas das geladeiras e botão de acionamento do fogão). Além dos pontos supracitados, foram analisadas 8 amostras de frango cozido e 8 amostras de chuchu, servidos na hora do almoço nas creches, além de 20 doces a base de creme de confeiteiro adquiridos em comércio local. Foi elaborado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp para coleta de *Staphylococcus* a partir das mãos e narinas dos manipuladores presentes nas cozinhas das creches. Cinquenta e sete isolados caracterizados como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* tiveram seu perfil bioquímico determinado e as espécies confirmadas de *Staphylococcus* seguiram para análise de detecção de enterotoxinas (SEA, SEB, SEC_{1,2,3}, SED e SEE). A modelagem matemática de produção da toxina, mediante inoculação em carne de frango da linhagem padrão *S.aureus* ATCC13565, foi realizada utilizando variáveis significativas a partir da combinação entre: temperatura, pH e concentração de sal. A análise dos parâmetros do modelo primário permitiu definir quais variáveis eram significativas sobre o tempo para

produção da toxina (TPT) bem como qual a influência das variáveis controladoras sobre o aumento/redução desse tempo. Foi elaborado um modelo polinomial de superfície de resposta com os fatores significativos para modelagem do TPT. O modelo obtido teve suas predições avaliadas estatisticamente utilizando o coeficiente de ajuste (R^2), fator bias, fator exatidão e relação $F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}$. Seis isolados recuperados a partir das instalações de cozinhas institucionais tiveram seus genes codificadores para SEs quantificados a partir de análise *Real Time quantitative PCR* (RT-qPCR). O presente trabalho identificou falhas nas práticas de manipulação de alimentos em creches municipais e sugestões de melhorias foram recomendadas. A construção de um modelo polinomial, simplificado, que descreveu o tempo para produção de SE poderá ser utilizado por microbiologistas de alimentos para análise de risco em carne de frango. Em adição, o conhecimento da expressão de genes codificadores de SE, ao longo da curva de crescimento bacteriano, colaboram para o melhor entendimento da epidemiologia da enfermidade.

ABSTRACT

According to Brazilian Ministry of Health (Brasil, 2013), between 2000-2013 were reported 8,857 outbreaks of diseases transmitted by food (DVA), involving more than 163,000 cases and at least 112 deaths (Brasil, 2013). The most common agents in outbreaks are *Salmonella* spp. (approx. 40%) and *Staphylococcus* spp. (approx. 20 %), and children under 4 years are most likely. In this scenario, the educational institutions represent the third most frequent location of DVAs (8%), behind residences (40 %) and restaurants (15%). Asepsis of handlers and food contact surfaces (SCA) are of utmost importance in the control and distribution of pathogens. Beyond the level of contamination by *Staphylococcus* spp., it is important to be aware of their ability to produce enterotoxin and how these vary according to changes in environmental conditions. Thus, this research aimed to establish the profile of contamination by potential producers of enterotoxins in institutional kitchens (childcare centers) and domestic kitchens, besides establishing a mathematical model that dictates the critical limits for toxin production. For this, samples were taken at specific points within the area of manipulation of 4 institutional kitchens and 10 residential kitchens in the city of Campinas, SP (utensils, cutting boards, sinks, refrigerators door handles and stove trigger button). In addition to the above points, 8 samples of cooked chicken meat and 8 samples of chayote, served in the lunchtime at childcare centers in and 20 sweet cream-based icing food purchased at local shops were analyzed. A Term of Free and Informed Consent Form (TCLE), approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences, Unicamp, for sampling of *Staphylococcus* from the nostrils and hands of food handlers was prepared. Fifty-seven isolates characterized as belonging to the *Staphylococcus* genus were determined and their biochemical profile established. Confirmed species of *Staphylococcus* followed for enterotoxin detection analysis (SEA, SEB, SEC_{1,2,3}, SED and SEE). Mathematical modeling of toxin production in chicken meat was performed using standard strain *S. aureus* ATCC 13565, using significant variables from the combination of temperature, pH and salt concentration. Analysis of the parameters of the primary model allowed to define significant variables over Time to Toxin Production (TPT), as well as the the influence of the controlling variables on the increase / decrease of this time. One polynomial response surface model with significant values for modeling the time to onset of the toxin factors

was developed. The obtained models were statistically evaluated using the adjustment coefficient (R^2), bias and accuracy factors and F_{calc}/F_{tab} relation. Six isolates recovered from institutional kitchen premisses had their SE encoding genes quantified by Real Time quantittative PCR analysis. The present research identified gaps in handling practices at isntitutional kitchens and suggestions for improvement in food handling were recommended. The construction of one simplified mathematical model that describes the time to produce SE can be used by food microbiologists for risk analysis in chicken meat. In addition, knowledge of SE encoding genes expression, along the bacteria growth curve, collaborate to a better understanding of illness epidemiology.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, mudanças no estilo de vida da população em geral, como a entrada da mulher no mercado de trabalho (Boomfield *et al.*, 2009) e o aumento do consumo de alimentos prontos com tempos de preparo menores (Etievant *et al.*, 2012), resultaram em grande impacto nos hábitos alimentares dos consumidores. A avaliação da contaminação microbiana das superfícies de contato com alimentos (SCA), assim como as condições de preparo das refeições e contaminação cruzada pós-processamento, preocupam autoridades de saúde pública, indústrias e consumidores (Kennedy *et al.* 2011; Taulo *et al.* 2009; Redmond *et al.* 2004; Kusumaningrum *et al.*, 2003; Gorman *et al.* 2002). De acordo com dados divulgados pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010), cerca de 2.2 milhões de pessoas morrem a cada ano devido à diarreia causada por água e alimentos contaminados. Desse total, 1,9 milhões são crianças.

As DVAs são causadas principalmente pela ingestão de células de micro-organismos viáveis (infecção), ingestão de suas toxinas (intoxicação) ou ingestão das células viáveis e posterior produção de suas toxinas, já no organismo do hospedeiro (toxi-infecção, Jay, 2005). No período de 2000 a 2013, foram notificados 8.857 surtos de DVAs no Brasil, envolvendo aproximadamente 163,000 doentes e pelo menos 112 óbitos (Brasil, 2013). Os agentes mais frequentes nos surtos foram *Salmonella* spp. (~40%) e em seguida *Staphylococcus* spp. (~20%; fig.1). Pelo fato de muitas vezes a doença provocada por *Staphylococcus* spp. não trazer consequências severas, acredita-se que esses números estejam abaixo da realidade, devido ao problema da sub-notificação dos casos. Além disso, análises envolvendo surtos procuram apenas por cepas coagulase-positivas da bactéria, apesar de ser claramente reportado na literatura a ocorrência de surtos envolvendo cepas coagulase negativa (Oliveira et al ,

2011.; Oliveira et al, 2010). Ainda de acordo com os dados do Ministério da Saúde (Brasil, 2013), as instituições de ensino representam o terceiro local mais frequente de ocorrência (~8%), atrás de residências (~40%) e restaurantes (~15%) (Brasil, 2013).

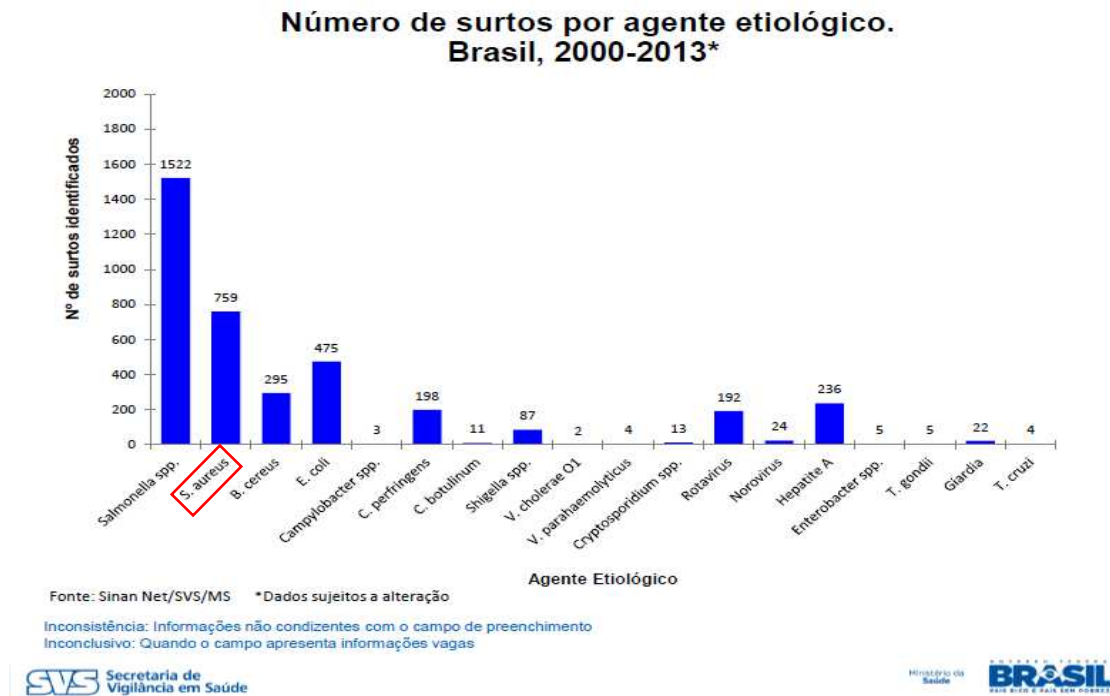


Figura 1. Agentes etiológicos identificados por surto no Brasil, período de 2000-2013. (Brasil, 2013).

A partir dos dados apresentados na figura 1, observa-se que as doenças causadas por micro-organismos são muito comuns. A maioria destes surtos poderia ser evitada se houvesse conhecimento prévio em boas práticas de manipulação por parte das pessoas responsáveis pelo preparo dos alimentos. Bactérias do gênero *Staphylococcus*, em especial, possuem baixa resistência térmica e poderiam ser eliminadas facilmente em processos de higienização e cocção adequados (Gotz *et al*, 2006). Apesar do número absoluto de pacientes ser menor, crianças até 4 anos estão na parcela da população com maior incidência de casos relacionados a DVAs, mostrando-se mais susceptíveis a esses micro-organismos (fig.2). Portanto, é de

extrema importância, para se garantir alimentos seguros, o cuidado elevado nas técnicas de limpeza/sanitização das instalações de cozinhas, além da antissepsia correta e boas práticas de manipulação das pessoas envolvidas no preparo de refeições.

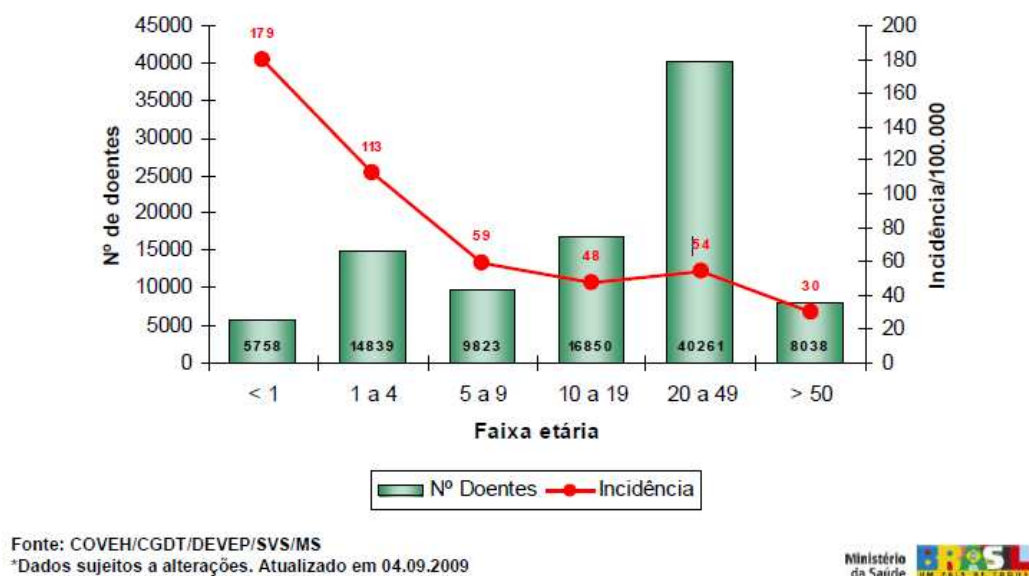


Figura 2. Doentes e incidência de DVA por faixa etária no Brasil, no período 1999-2009 (Brasil, 2009).

A tabela 1 uma coletânea de dados de surtos de DVAs envolvendo *Staphylococcus*.

Tabela 1. Alguns casos relatados de surtos de DVAs provocadas por *Staphylococcus*, ao longo dos anos. Adaptado de Hennekinnen *et al*, 2012

Ano	Local de ocorrência	Alimento envolvido	Número de doentes	SE Associada
1971	Exército britânico	Presunto	100	SEE
1983	Navio de cruzeiro, Caribe	Sobremesa a base de creme	215	Não informado
1985	Escola primária, Kentucky	Achocolatado	>1000	SEA
1986	Country Club, Novo México	Peru, frango	67	SEC
1992	Escola primária, Texas	Salada de frango	1364	Não informado
1998	Minas Gerais	Frango, arroz e feijão	4000	SEA, SEB, SEC
2000	Osaka, Japão	Leite semi-desnatado	13 420	SEA
2007	Escola primária, Áustria	Leite	166	SEA e SED
2009	Festival universitário de Nagoya, Japão	Crepe	75	SEA e SEC

De acordo com os dados apresentados na tabela 1, pode-se observar que muitos casos de surtos envolvendo *Staphylococcus* estão relacionados a refeições servidas a um grande número de pessoas simultaneamente, o que pode indicar a falta de perícia por parte dos manipuladores ao preparar grandes quantidades de alimento.

Staphylococcus estão amplamente distribuídos no ambiente, inclusive na epiderme do homem e animais domésticos (Franco & Landgraf, 2005). A manipulação e armazenagem inadequadas de alimentos, deficiência no processo de sanitização das SCA e demais instalações em cozinhas podem acarretar em contaminação pelo patógeno, com posterior multiplicação e ocorrência de surtos de DVAs nestes locais.

Visando reduzir a ocorrência de DVAs, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou em 2001 o programa "Cinco passos para alimentação mais segura" no qual cinco etapas são recomendadas para evitar a propagação de alimentos contaminados. São eles: 1. manutenção da limpeza e higiene dos locais de trabalho; 2. manter os alimentos crus separados dos alimentos cozidos; 3. cocção adequada dos alimentos; 4. manter os alimentos em temperaturas seguras e 5. usar água tratada e matérias-primas de qualidade.

Considerando-se que muitas vezes as técnicas de higiene/sanitização são inadequadas ao longo do preparo dos alimentos, faz-se necessário a inserção de variáveis que possam atuar como barreira para impedir/retardar o crescimento/produção de enterotoxina por linhagens de *Staphylococcus* quando presentes em alimentos.

2. OBJETIVOS

Sendo assim, os objetivos desta pesquisa foram:

- Detectar, enumerar e caracterizar as populações de *Staphylococcus* spp. provenientes de alimentos prontos para o consumo e de superfícies de instalações de cozinhas residenciais e institucionais;
- Conscientizar manipuladores de cozinhas de creches do município de Campinas, SP/Brasil, através de palestras envolvendo o conhecimento de boas práticas de manipulação e preparo de alimentos;
- Avaliar a capacidade de produção de enterotoxina dos isolados de *Staphylococcus in vitro* e definir qual cepa produz SE em menor tempo;
- Detectar genes codificadores de enterotoxinas produzidas pelos isolados provenientes do ambiente e quantificação de sua expressão através de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR);
- Utilizando uma cepa padrão produtora de enterotoxina A (*S. aureus* ATCC 13565), determinar em função do tempo de incubação a produção de enterotoxina em carne de frango cozida através de um modelo polinomial preditivo de superfície de resposta, em função das seguintes variáveis: temperatura, pH e concentração de sal.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Staphylococcus e suas enterotoxinas*

Membros do gênero *Staphylococcus* estão amplamente distribuídos na natureza. Como resultado de sua grande habilidade de adaptação, os estafilococos são os principais micro-organismos residentes da pele, glândulas e mucosas de mamíferos e pássaros (Gotz *et al*, 2006). Estafilococos são bactérias que possuem morfologia de cocos, Gram positivas, DNA G + C 33-40%, não formadores de esporos, catalase positiva e anaeróbicos facultativos pertencentes à família *Staphylococcaceae* (Garrity & Holt, 2001).

Existem tanto espécies coagulase positiva como negativa, sendo a enzima desoxirribonuclease termorresistente produzida por 99% das linhagens coagulase positiva (Park *et al*. 1980). Classificados como micro-organismos mesófilos, podem apresentar crescimento entre 10 e 46°C, sendo a faixa de temperatura ótima de crescimento de 30-37 °C, com pH ótimo perto da neutralidade (6.0 e 7.0). Com relação a A_a, considera-se um valor mínimo 0.86 mas há registros de crescimento com valores inferiores a 0.83 (Jay, 2005).

Podem ser diferenciados de outros gêneros pertencentes à família pela sua sensibilidade aos antibióticos lisostafina, eritromicina, bacitracina e furazolidona (Gotz, *et al*, 2006).

A espécie *S. epidermidis* é considerada a mais prevalente e persistente na pele humana. É encontrada praticamente em toda a superfície do corpo e pode atingir elevadas populações onde há nutrientes e umidade suficientes, como por exemplo, nas narinas, axilas, área inguinal e perineal, e entre os dedos. Em humanos, *S. aureus* tem como nicho preferido as narinas (Scheifler & Kloos, 1975b).

Algumas espécies, como *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. hyicus* são considerados como potenciais patógenos oportunistas, causando furúnculos, pneumonia, bacterímia, meningite entre outras enfermidades em humanos. A linhagem MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) emergiu nos anos 1980 e é de extrema importância clínica e epidemiológica em hospitais (Gotz *et al*, 2006).

A intoxicação alimentar é comumente associada com linhagens de *S.aureus* coagulase positiva, embora surtos ocasionais tenham sido causados por espécies coagulase negativa (Bergdoll, 1989; Oliveira *et al*, 2010). É importante ressaltar que a atual legislação brasileira, de acordo com a Resolução RDC 12 (Brasil, 2001), só prevê a enumeração de estafilococos coagulase positiva, não sendo incluídos os estafilococos coagulase negativa.

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são geralmente formadas no final da fase exponencial ou na fase estacionária de crescimento, com exceção da SEA, formada durante a fase exponencial (Tremaine *et al*, 1993). A intoxicação ocorre quando são ingeridos alimentos contaminados que possuam condições favoráveis de crescimento à bactéria e produção da enterotoxina. As enterotoxinas podem ser formadas em uma ampla faixa de temperatura, sendo a temperatura ótima para a produção ligeiramente superior à temperatura ótima de crescimento da célula (Schmitt *et al*, 1990). Abaixo de pH 5.0 e Aa 0.83 não há produção da toxina (Tranter, 1990).

Atualmente são conhecidas mais de 20 enterotoxinas (tabela 2, adaptado de Hennekinne *et al*, 2012). São proteínas de baixo peso molecular (26 – 29.000 Daltons; Bergdoll, 1989), resistentes ao congelamento, secagem, baixos valores de pH (Hennekinne *et al*, 2012) e termorresistentes ($D_{121.1}$ para SEB 9.9-11.4 min; Genigeorgis, 1989). São ricas em aminoácidos lisina, ácido aspártico e ácido glutâmico, e a maioria apresenta alça de cistina, a qual está provavelmente relacionada à sua atividade emética. São resistentes à

ação de enzimas proteolíticas do sistema digestório e são hidrossolúveis (Le Loir *et al*, 2003). A quantidade de enterotoxina necessária para manifestação dos sintomas é bem pequena, cerca de 100ng/mL (Bergdoll.,1991).

Tabela 2. **Enterotoxinas Estafilocócicas (SEs).**

Toxina	Peso Molecular (Da)	Base Genética	Modo de ação	
			Superantígeno	Emética
SEA	27 100	Profago	+	+
SEB	28 336	Cromossomo, plasmídio	+	+
SEC _{1,2,3}	~27 500	Plasmídio	+	+
SED	26 360	Plasmídio	+	+
SEE	26 425	Profago	+	+
SEG	27 043	Enterotoxin gene cluster (<i>egc</i>), cromossomo	+	+
SEH	25 210	Transposon	+	+
SEI	24 928	<i>egc</i> , cromossomo	+	(+)*
SEIJ	28 565	Plasmídio	+	n.c.**
SEK	25 539	“Ilha de patogenicidade”	+	n.c.
SEIL	25 219	“Ilha de patogenicidade”	+	n.c.
SEIM	24 482	<i>egc</i> , cromossomo	+	n.c.
SEIN	26 067	<i>egc</i> , cromossomo	+	n.c.
SEIO	26 777	<i>egc</i> , cromossomo	+	n.c.
SEIP	26 608	Profago	+	n.c.
SEIQ	25 076	“Ilha de patogenicidade”	+	-
SER	27 049	Plasmídio	+	+
SES	26 217	Plasmídio	+	+
SET	22 614	Plasmídio	+	(+)
SEIU	27 192	<i>egc</i> , cromossomo	+	n.c.
SEIU ₂	26 672	<i>egc</i> , cromossomo	+	n.c.
SEIV	24 997	<i>egc</i> , cromossomo	+	n.c.

*fraco positivo ** não conhecido. Adaptado de Hennekinne *et al*, 2012

As SEs possuem atividade de superantígeno (SAg), ou seja, estimulam a proliferação de células T inespecíficas (figura 3). Originalmente, os SAgS de *S. aureus* foram denominadas como SE devido a sua capacidade de provocar quadros de vômitos e diarreias após ingestão (Grumann et al, 2014). Entretanto, o Comitê Internacional para Nomenclatura de Superantígenos Estafilocócicos introduziu nova nomenclatura em 2004,

distinguindo as enterotoxinas com capacidade emética em primatas (SE) daquelas nas quais as propriedades eméticas permanecem não estabelecidas (SE-like, Grumann *et al*, 2014). Toxinas esfoliativas e TSST-1 (Toxic Sock Syndrome Toxin, antiga SEE) também possuem modo de ação de superantígeno (Balaban e Rasooly, 2000). As toxinas esfoliativas provocam descamação da pele principalmente de crianças, enquanto que a TSST-1 causa a Síndrome do Choque Tóxico, cujos sintomas são hipotensão, febre e erupções cutâneas.

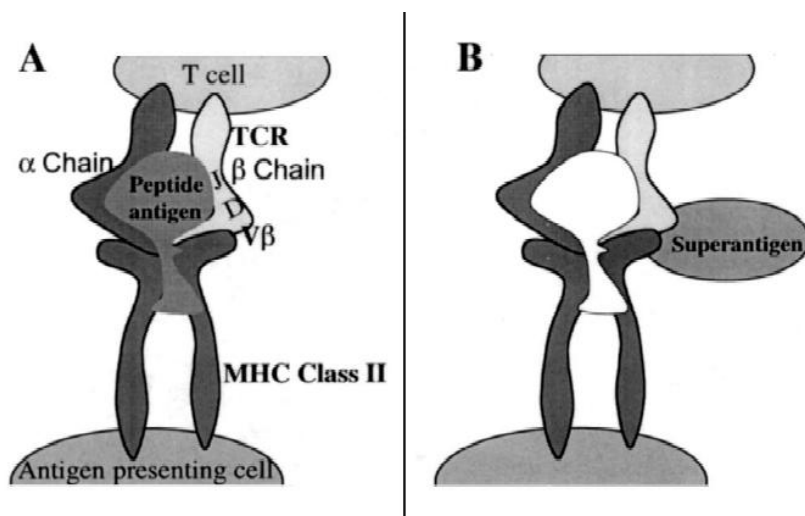


Figura 3. (A) Antígeno convencional. O antígeno é apresentado pelo MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) classe II, que atraem células T específicas ao antígeno. (B) o superantígeno se liga diretamente fora do MHC e cruza com a cadeia V β , iniciando a proliferação de células T inespecíficas. Retirado de Balaban e Rasooly, 2000.

3.2. Caracterização e identificação de *Staphylococcus* spp. e suas enterotoxinas

Os métodos para caracterização e identificação para o gênero *Staphylococcus* estão descritos na literatura mais especificamente para *S.aureus* (Lancette e Bennette, 2001). Suas principais características seletivas em relação a outros micro-organismos são: habilidade de crescer na presença de NaCl (5,5 a 10%), telurito de potássio (0,0025 a 0,005%), cloreto de lítio (0,01 a 0,05%), glicina (0,12 a 1,26%) e polimixina (40 mg/L). O

meio sintético mais utilizado e recomendado pela *American Public Health Association* (APHA) é o Baird-Parker (BP), que acrescido de uma solução de 1% de telurito de potássio e uma solução 5% de gema de ovo estéril, obtém colônias circulares pretas (redução do telurito) com formação de halo de lecitinase (hidrólise da gema de ovo) ao redor das colônias positivas. As atividades das enzimas coagulase e termonuclease também podem ajudar na caracterização. Essas são características diferenciais para *S. aureus*. Porém podem crescer também na placa colônias atípicas, de coloração acinzentada e sem o halo de lecitinase, potencialmente outras espécies do gênero *Staphylococcus* (fig. 4)

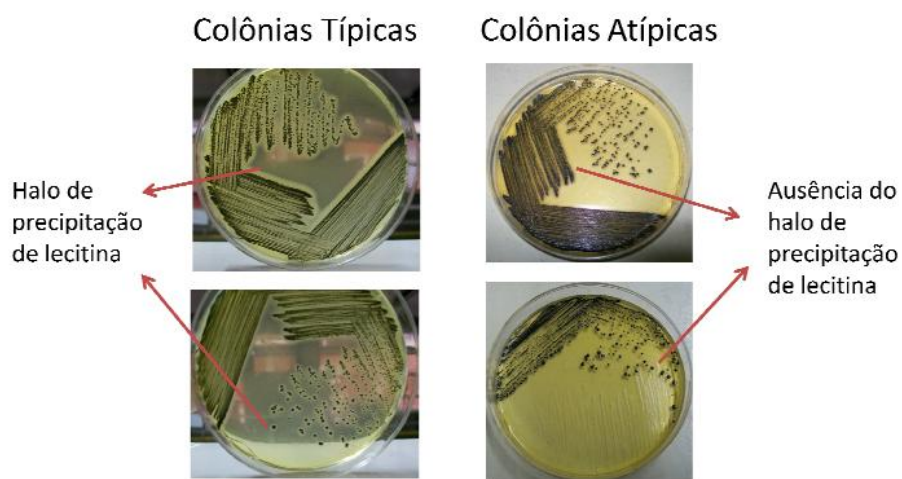


Figura 4. Colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus*. Imagem gentilmente cedida por Isabela Mateus Martins.

3.2.1. Testes adicionais

Isolados com boa porcentagem de identificação (>75%) podem ser encaminhados para testes complementares, como susceptibilidade ao antibiótico furazolidona ou lisostafina, teste de coagulase e teste de termonuclease.

3.2.2. Susceptibilidade à Furazolidona

O procedimento consiste na inoculação de culturas líquidas (crescimento prévio em caldo BHI 37°C/24h) em placas de Agar Peptona adicionado de 20µg/mL de Furazolidona (Sigma, EUA) por 37°C/24-48h. Colônias de *Staphylococcus* não são capazes de se desenvolver neste meio, pois são susceptíveis ao antibiótico (Von Rheinbaben e Hadlok, 1981).

3.2.3. Coagulase

O teste da enzima coagulase avalia a capacidade do *Staphylococcus* de coagular o plasma sanguíneo humano ou de outros animais (Downes e Ito, 2001). O teste laboratorial é realizado em plasma de coelho, e o resultado positivo pode indicar um potencial estafilococo enterotoxigênico. Em casos de surtos de DVAs, nos quais *Staphylococcus* são suspeitos de envolvimento, a legislação brasileira prevê a análise de cepas coagulase-positivas. A figura 5 apresenta tubos com cepas coagulase-positivas e -negativas. Na tabela 3 são mostradas as espécies coagulase-positivas e -negativas de *Staphylococcus*.

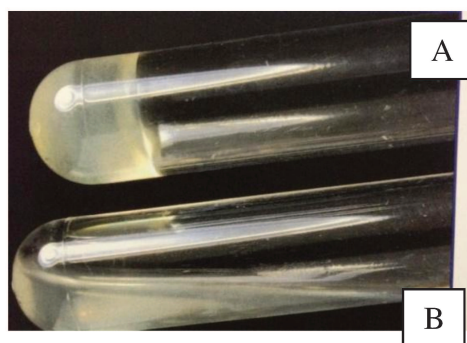


Figura 5. Resultados para o teste de coagulase. A) teste positivo; B) teste negativo.

Tabela 3. Caracterização das espécies quanto à atividade da enzima coagulase

Espécie	Coagulase
<i>S. aureus</i>	+
<i>S. aureus subsp. anaerobius</i>	+
<i>S. delphini</i>	+
<i>S. hyicus</i>	+
<i>S. intermedius</i>	+
<i>S. lutrae</i>	+
<i>S. schleiferi subsp. coagulans</i>	+
<i>S. auricularis</i>	-
<i>S. capitis</i>	-
<i>S. capitis subsp. ureolyticus</i>	-
<i>S. caprae</i>	-
<i>S. carnosus</i>	-
<i>S. carnosus subsp. utilis</i>	-
<i>S. chromogenes</i>	-
<i>S. condimenti</i>	-
<i>S. epidermidis</i>	-
<i>S. felis</i>	-
<i>S. haemolyticus</i>	-
<i>S. hominis</i>	-
<i>S. lugdunensis</i>	-
<i>S. sciuri subsp. carnaticus</i>	-
<i>S. sciuri subsp. rodentium</i>	-
<i>S. schleiferi</i>	-
<i>S. muscae</i>	-
<i>S. pasteurii</i>	-
<i>S. piscifermentans</i>	-
<i>S. saccharolyticus</i>	-
<i>S. simulans</i>	-
<i>S. succinus</i>	-
<i>S. warneri</i>	-

3.2.4. Termonuclease

O teste consiste na avaliação da produção da enzima termonuclease, que pode ser termorresistente ou termossensível. O teste consiste em 2 etapas: a inoculação de algumas gotas da cultura líquida de *Staphylococcus* sobre uma lâmina recoberta de Agar Azul de Toluidina, sendo que uma das amostras deve ser previamente mantida a 100°C por 15 minutos. A segunda etapa consiste na visualização do agar. O desenvolvimento de um halo

lilás ao redor dos poços indica que a enzima é termossensível, ou seja, não se manteve estável ao tratamento. A manutenção da cor azulada indica termorresistência da enzima (fig. 6). *Estafilococos enterotoxigênicos* apresentam termonucleases termorresistentes (Lancette e Bennett, 2001).

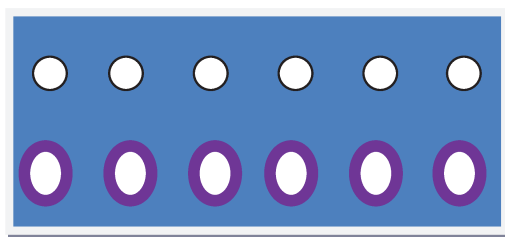


Figura 6. Os poços com coloração azul inalterada indicam presença de enzima termorresistente e os poços com coloração amarelada indicam presença de enzima termossensível.

3.3. Identificação em nível de espécie

Espécies do gênero *Staphylococcus* possuem uma ampla variedade metabólica, e assim, torna-se muito laborioso a realização de diversos testes para podermos determinar com precisão a espécie estudada. Com a finalidade de otimizar o tempo de experimentos, diversos testes bioquímicos miniaturizados foram desenvolvidos por diferentes empresas e posteriormente oficializados pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC).

Um exemplo de teste disponível comercialmente é o *API[®] Staph* (bioMérieux). É um sistema padronizado para a identificação de espécies de *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Kokuria*. A galeria de testes do kit comporta 20 microtubos, que contém diferentes substratos desidratados (fig. 7). Os microtubos são inoculados com uma suspensão bacteriana, padronizada em aproximadamente 6.8×10^8 UFC/mL (escala 2 McFarland). As reações produzidas durante o período de incubação traduzem-se por alterações espontâneas das cores ou por adição de reagentes específicos.

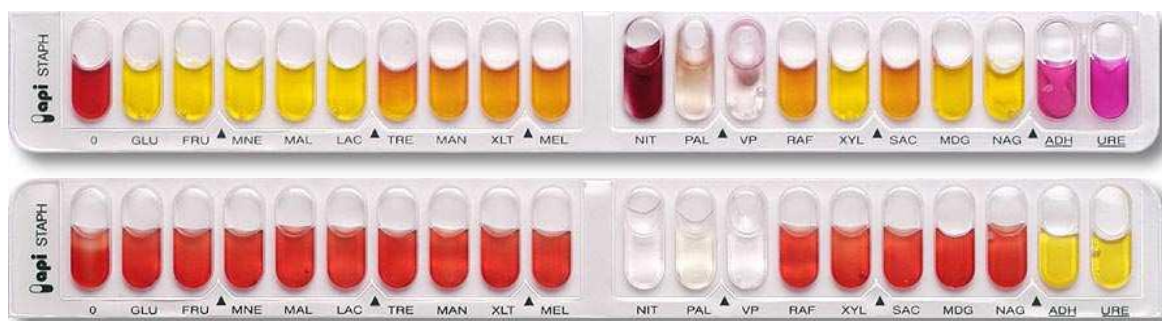


Figura 7. Resultados positivos (acima) e resultados negativos para os testes da galeria API® Staph.

A identificação é obtida através de um perfil numérico. Na ficha de resultados, os testes são separados a cada grupo de 3 poços, e um valor 1, 2 ou 4 é indicado para cada um. Para cada teste positivo, o número indicado é somado a outro(s) teste(s) positivo(s), obtendo-se assim um máximo de 7 pontos para cada grupo de 3 testes (fig.8). Este perfil numérico é introduzido no sistema *apiweb* (v.4.1) e é exibido então a espécie estudada e a percentagem de confiabilidade do teste (fig.9)

Figura 8. Perfil numérico do sistema API Staph (bioMérieux).

EXCELENTE IDENTIFICAÇÃO				
Galeria	API STAPH V4.1			
Perfil	- + + + + + + + + ? + + + + - + + + -			
Nota(s)				
Taxons significativos	% ID	T	Teste(s) por aproximação	
Staphylococcus lentus	99.9	0.85		

Figura 9. Exemplo de resultado obtido pelo sistema *apiweb* (bioMérieux).

3.4. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas

Para detecção das enterotoxinas estafilocócicas, os ensaios imunológicos são mais baratos e de simples realização do que ensaios biológicos. Os testes disponíveis basicamente fundamentam-se na interação de um antígeno (no caso específico, a enterotoxina) e um anticorpo. Os níveis de detecção podem chegar até 0.05ng/mL em meio de cultura (Lancette & Bennett, 2001). As técnicas mais sensíveis são o *ELISA* (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), LA (*Latex agglutination*), RPLA (*Reversed passive latex agglutination*) e *ELFA* (*Enzyme linked Fluorescent Assay*)(Bennete, 2005).

O desenvolvimento de *kits* comerciais, baseado nas técnicas acima citadas, facilitou o trabalho dos pesquisadores, permitindo a obtenção de resultados com mais rapidez. O *kit* VIDAS® Staph enterotoxin II (SET2, bioMérieux), é um teste imunoenzimático que permite a detecção de enterotoxinas estafilocócicas pelo método ELFA, com o auxílio do sistema automatizado *miniVidas* (fig.10)



Figura 10. Sistema automatizado para detecção de enterotoxinas estafilocócicas miniVidas (bioMérieux).

O *kit* SET2 é um método direto de *screening* de produtos alimentares para sete toxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC_{1,2,3}, SED e SEE). Após um simples protocolo de extração (que varia de acordo com o produto), o teste é completamente automatizado e os resultados são obtidos em 80 minutos. O *kit* SET2 consiste de uma série de cones e barretes para inoculação da amostra. O cone, de utilização única, serve tanto de fase sólida como suporte de pipetagem (fig.11a). Seu interior é revestido por anticorpos antienterotoxinas adsorvidos em sua superfície. Os outros reagentes da reação imunológica estão prontos para o uso e distribuídos de 10 pequenos poços ao longo do barrete (fig. 11b)

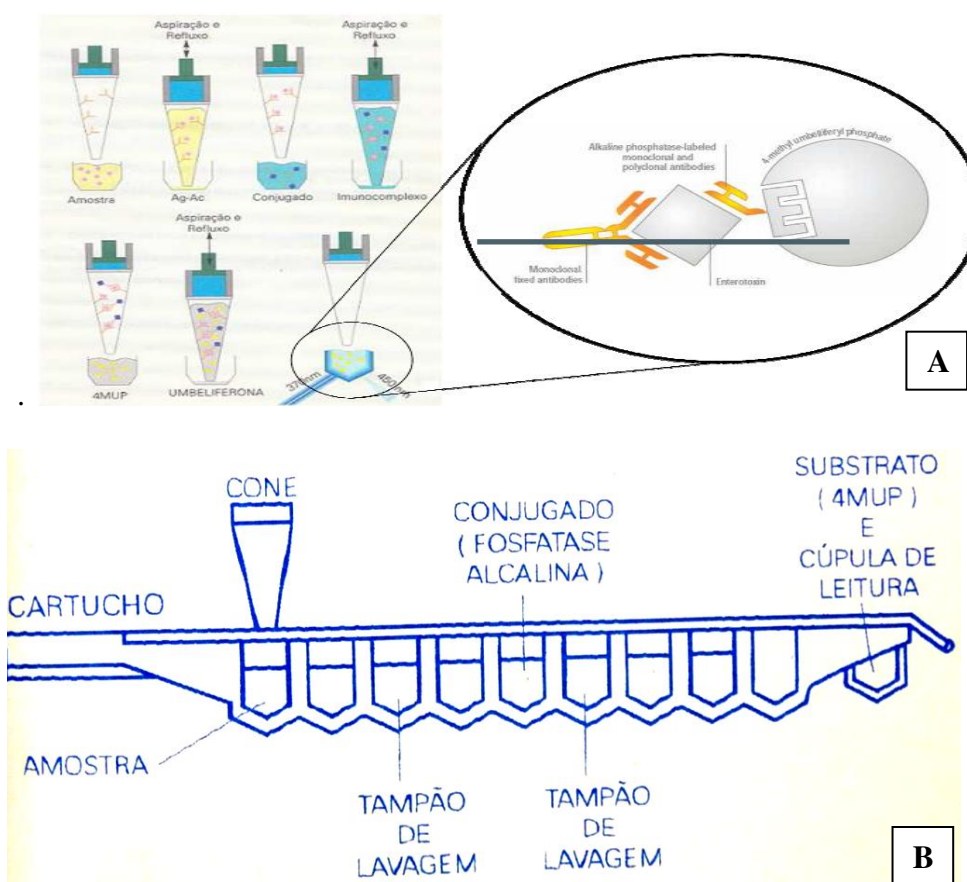


Figura 11. A) cones adsorvidos com anticorpos antienterotoxinas; B) visão lateral do barrete com as outras reações imunológicas (bioMérieux).

Todas as etapas do teste são realizadas automaticamente no aparelho e são constituídas por uma sucessão de ciclos de aspiração e distribuição no meio reacional. Uma parte do extrato do alimento é depositada no primeiro poço do barrete (0.5mL) e os antígenos presentes vão fixar-se aos anticorpos antienterotoxinas presentes no interior do cone no primeiro ciclo de aspiração. As etapas de lavagem eliminam os componentes não fixados. Em seguida, os anticorpos conjugados marcados com fosfatase alcalina são aspirados e vão fixar-se às enterotoxinas estafilocócicas, previamente fixadas aos anticorpos presentes na parede do cone. Novas etapas de lavagem eliminam o conjugado não fixado.

Durante a etapa final de revelação, o substrato 4-metil umbeliferil fosfato (4 MUP) é aspirado e dispensado pelo cone; a enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise deste substrato em 4-metil –umbeliferona, cuja fluorescência emitida é medida a 450nm. Terminado o teste, os resultados são calculados automaticamente pelo sistema. O Valor Relativo de Fluorescência (RFV) obtido é calculado e convertido pelo computador em um valor de teste (VT), que corresponde ao valor do sobrenadante dividido pelo valor de fluorescência padrão (fig.7A). Resultados de $VT \geq 0.13$ e $RFV > 450$ indicam positividade da amostra, com sensibilidade de detecção de 0.05ng/mL de enterotoxina (fig.12)

```
mini VIDAS Listagem
Seção: A
Completo: 13:05:58 25Fev11
Staph enterotoxin II (SET2)
Vers.: R5.6.0
Lot.: 110707-0
Std. utiliz.:
Completo: 14:32:05 22Fev11
RFV = 4040
VT Negativo < 0.13
VT Positivo >= 0.13

Posição: A1
ID amostra: T208SAL
Branco: 288 RFV: 11278
VT: 2.79 Resultado: Positivo

Posição: A2
ID amostra: T22.2SAL
Branco: 285 RFV: 9883
VT: 2.44 Resultado: Positivo
```

Figura 12. Exemplo de resultado final com $VT \geq 0.13$ e $RFV > 450$.

O sistema não fornece a quantidade exata de enterotoxina presente na amostra. Para estimar a quantidade de SEA nas amostras, Asao e colaboradores (2003) inocularam 0.1, 0.25, 0.5 e 1.0 ng/mL em leite com baixa concentração de gordura e em leite em pó desnatado 10%. Após extração, as amostras foram diretamente quantificadas no aparelho *miniVidas* (bioMérieux). O valor de RFV=450 mostrou aproximadamente 0.2ng/mL de SEA.

3.5. Fontes de contaminação

As superfícies de contato de alimentos são de extrema importância no controle da contaminação e distribuição de patógenos. No ambiente físico de uma creche, fatores como higiene e preparo de alimentos podem desempenhar um papel importante na transmissão de doenças infecciosas entre crianças (Petersen e Bressler, 1986). O próprio alimento pode ser a porta de entrada para os micro-organismos às cozinhas. Carne de frango crua é um dos principais veículos de contaminação, e a carcaça de aves pode conter até 10^8 de células de *Campylobacter* (Humphrey *et al*, 2001).

Lavagem das mãos, manipulação de forma inapropriada, tempos de cocção insuficientes e armazenagem de alimentos em temperaturas não adequadas por longos períodos de tempo contribuem para a disseminação da contaminação (Azevedo *et al*, 2014). A falta de higiene do manipulador pode acarretar na transmissão de micro-organismos de suas mãos ou roupas para o alimento (Rodrigues *et al*, 2004).

Na tabela 4 estão apresentadas algumas pesquisas relacionadas às fontes de contaminação presentes nas instalações de cozinhas, tanto institucionais quanto residenciais.

Tabela 4. Contaminação em ambientes de cozinhas.

Micro-organismos	Amostragem	Maior incidência	Contagens mais elevadas	Pesquisadores
<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva, <i>Listeria</i> spp. e <i>Campylobacter</i> spp.	Instalações de cozinhas residenciais	<i>Staphylococcus</i>	4-5 log ₁₀ UFC/ swab (maçaneta de geladeira)	Azevedo e colaboradores (2014)
<i>S. aureus</i>	Mãos	<i>S. aureus</i>	36,1% de amostras positivas	Bassyouni e claboradores (2012)
<i>Enterobacteriaceae</i> e <i>S. aureus</i>	Mãos e fossas nasais, queijos típicos no Egito	<i>Enterobacteriaceae</i>	6,79 log ₁₀ UFC/g (queijos)	Fadel e Ismail (2009)
Coliformes totais e <i>E. coli</i>	SCAs e troca de fraldas (creches)	Coliformes totais	0,81 log ₁₀ UFC/50cm ² (SCAs)	Cosby e colaboradores (2009)
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Mãos	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	53,3% de amostras positivas	Soares e colaboradores (2009)
Coliformes termotolerantes	Mãos	Coliformes termotolerantes	55,6% de amostras positivas	Campos e colaboradores (2009)
<i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	Mãos e fossas nasais	<i>S. aureus</i>		Souza e colaboradores (2008)
Coliformes totais, termotolerantes e contagem total de mesófilos	Utensílios usados em cozinhas domésticas	Contagem total de mesófilos	8,08 log ₁₀ UFC/mL (pano de prato)	Rusin e colaboradores (1998)

Os dados apresentados na tabela 4 mostram a importância da realização do levantamento microbiológico, principalmente de espécies patogênicas, nos ambientes de preparo e estocagem de alimentos. É importante ressaltar a análise de locais de contato

direto com os alimentos (como por exemplo, tábuas de corte e utensílios) e locais de contato indireto, como maçanetas de portas e geladeiras. Utensílios utilizados na limpeza do ambiente, como esponjas de lavagem e panos de prato, concentram alta contaminação pelo fato de serem usados exaustivamente, e podem se tornar veículos de transmissão. Além disso, a verificação da antissepsia por parte dos manipuladores é de extrema importância para se evitar contaminação cruzada.

O patógeno *Staphylococcus aureus* é altamente susceptível a tratamentos térmicos e sanitizantes, e sua presença nas superfícies de trabalho e mãos de manipuladores geralmente indicam condições precárias de higienização e antissepsia. Porém, muitas linhagens são produtoras de enterotoxinas, que por sua vez, são bastante termorresistentes e causadoras de doenças humanas (Gotz *et al*, 2006).

Alimentos geralmente envolvidos em surtos são carnes cozidas (especialmente presuntos), cremes e bolos, saladas com batatas e frango. Entre as causas dos surtos, podemos citar a conservação inadequada dos produtos (abuso de temperatura), a falta de higiene na manipulação e contaminação cruzada (Hennekinne *et al*, 2012).

3.6. Contaminação ambiental vs. segurança alimentar

Manipulação e práticas de higiene adequadas são ferramentas efetivas para prevenir a propagação de micro-organismos pelo ambiente (Kitamoto *et al*, 2009). Entretanto, estas práticas não são aplicadas da mesma maneira por todas as pessoas residentes no mesmo local de trabalho ou residência, o que pode afetar o efeito microbiocida dos produtos de sanitização (Jong *et al*, 2008). Além disso, utensílios utilizados para limpeza, como panos de prato ou esponjas, podem agir como reservatório e disseminador de micro-organismos patogênicos (Kagan *et al*, 2002; Rossi *et al*, 2013).

As medidas mais importantes para manter um controle eficiente incluem a redução da carga microbiana oriunda de fontes externas (como impedir a entrada de caixas e *pallets* nos ambientes de cozinha), avaliação microbiológica periódica de pontos considerados vulneráveis e processos de limpeza e desinfecção adequados (Wirtanen e Salo, 2003).

Práticas em segurança alimentar, como controle de temperatura durante estocagem ou distribuição, equipamentos e ambientes limpos e higienizados, resultam em economia de gastos e energia (Grisntead, 2013). Tradicionalmente, a adição de NaCl tem sido usada como agente preservativo, baixando a atividade de água e consequentemente limitando o crescimento de patógenos e deterioradores em alimentos (Doyle e Glass, 2009). No entanto, ingestões de quantidades do sal acima do recomendado podem provocar, entre outros problemas, aumento da pressão arterial e doenças coronárias (Dickinson e Havas, 2007).

O desenvolvimento de técnicas moleculares tornou possível reunir rapidamente informações sobre o genoma de espécies microbianas de interesse. Tais informações podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos métodos de rastreabilidade e predição do comportamento de micro-organismos sob condições ambientais de estresse (Havelaar *et al.* 2010).

A segurança alimentar microbiológica difere drasticamente da segurança alimentar química. Enquanto resíduos químicos e aditivos tipicamente entram em etapas conhecidas do processo, micro-organismos podem entrar em qualquer etapa (Havelaar *et al.* 2010). DVAs são mais aceitas pela população como “fatos da vida”, desde que não haja sequelas permanentes ou morte (Hansen *et al.*, 2003). Portanto, há a necessidade da implementação da chamada “cultura em segurança alimentar” em todas as esferas da sociedade (Powell *et al.*, 2010).

O monitoramento da presença de patógenos no produto/alimento final é uma medida usualmente ineficiente de controle de risco. Geralmente, quando o micro-organismo é detectado, o momento adequado para se tomar medidas corretivas já passou (Havelaar *et al*, 2010). Medidas pró-ativas, predizendo onde possíveis problemas podem surgir, são preferíveis a detectá-los posteriormente.

Educação e treinamento são o foco de muitos especialistas em segurança alimentar. Porém, Roberts (2008) sugere que o impactos dos programas de treinamento são inconsistentes, e a avaliação pós programa raramente é conduzida. Chapman e colaboradores (2010) sugerem que a única medida confiável, para medir a efetividade das boas práticas de manipulação, é através da observação direta dos agentes de segurança alimentar nos locais de preparo de alimentos.

Para tanto, os fiscais têm à disposição critérios estabelecidos pela legislação local para avaliação dos locais de prestação de serviços ligados à alimentação. A legislação brasileira, por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (ANVISA, RDC nº12, 2 de janeiro de 2001), versa sobre os padrões microbiológicos para alimentos. A regulamentação é indispensável para a avaliação das Boas Práticas de Produção de Alimentos e Prestação de Serviços, da aplicação do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e da qualidade microbiológica dos produtos alimentícios, incluindo a elucidação de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs).

Na regulamentação, são descritos níveis populacionais aceitáveis de presença de micro-organismos, patogênicos e deterioradores, em diversos alimentos.

3.7. Microbiologia Preditiva

3.7.1. Clássica - *Histórico e definições*

O uso de modelos matemáticos na microbiologia de alimentos começou aproximadamente em 1920, com o desenvolvimento de métodos para calcular o tempo de destruição térmica de micro-organismos, sendo que, na época estes modelos revolucionaram a indústria de enlatados (Nakashima *et al.*, 2000). Porém, o artigo publicado em 1983 por Roberts e Jarvis pode ser considerado o marco inicial da microbiologia preditiva, onde foi levantado o questionamento se seria possível obter uma resposta satisfatória do comportamento do crescimento de micro-organismos e produção de seus metabólitos em condições reais de produção e estocagem de produtos (Nakashima *et al.*, 2000).

Sob esse enfoque, Jagannath e Tsuchido (2003) sugerem a aplicação da pesquisa com preocupação de quantificar a ecologia microbiana dos alimentos baseando-se na premissa de que as respostas de populações microbianas a fatores ambientais (por exemplo, temperatura), são reprodutíveis e que a partir da caracterização de ambientes é possível prever a resposta dos micro-organismos em ambientes similares. Segundo Geeraerd e colaboradores (2004) a microbiologia preditiva lida com o desenvolvimento de modelos matemáticos que descrevem a evolução microbiana em meios sintéticos e matrizes alimentares em função das condições ambientais.

Já para Zurera-Cosano *et al.* (2006), a microbiologia preditiva é uma ferramenta usual na indústria de alimentos utilizada para prever o comportamento dos micro-organismos, sendo que os parâmetros de crescimento secundários descrevem a dependência dos parâmetros do modelo primário com relação a fatores ambientais como temperatura, A_a , pH e concentração de ácidos orgânicos. Estes modelos têm por objetivo permitir a

interpolação e extrapolação dos resultados obtidos na região das observações para a região predita, considerando as interações entre dois ou mais fatores.

A partir do fim dos anos 1980s, o desenvolvimento de *softwares* especializados, como por exemplo, *COMBase Program* (Inglaterra) e *Pathogen Modeling Program* (PMP, Estados Unidos) permitiram a ampliação do conhecimento e estudos relacionados à modelagem matemática dos micro-organismos, principalmente na habilidade de solucionar rapidamente as complexas equações envolvidas (Buchanan, 1993a).

Apesar de empíricos, os modelos matemáticos definidos para avaliar a segurança e qualidade dos alimentos são baseados em técnicas de regressão linear e não-linear. Assim, a parcimônia em relação aos dados deve sempre ser observada (McMeekin *et al.*, 2003).

Segundo Draper e Smith (1981), e também Farber (1986), o desenvolvimento de um modelo pode ser definido em 5 etapas:

➤ **Planejamento:**

Variável (eis) independente (s): comportamento microbiano determinado basicamente por 3 a 5 fatores, principalmente temperatura, pH, A_a e composição gasosa do ambiente. Usar valores da variável independente fora da faixa estudada para desenvolver o modelo é perigoso (Whiting, 1997).

Variável dependente: a resposta primária medida é usualmente a mudança da densidade da população bacteriana ao longo do tempo, seja expressa em velocidade de crescimento, duração da fase lag ou tempo para aparecimento do defeito ou produção de uma toxina (Whiting, 1997).

Inóculo: a maior parte dos modelos de crescimento utilizam como inóculo culturas incubadas em meio de cultura por até 24h/37°C (Whiting, 1997).

Modelo experimental: o modelo preditivo será sempre baseado em um meio de crescimento, que pode ser um meio sintético ou o próprio alimento. Porém, os meios sintéticos podem não simular com exatidão a condição real existente no alimento escolhido para o estudo. Portanto, modelos gerados a partir de um alimento são específicos para aquele alimento. Ross e McMeekin (1991) concluíram que os modelos cinéticos seriam melhor desenvolvidos se fossem realizados em 3 etapas: 1. medida da variável dependente a intervalos pequenos das variáveis independentes, em um meio sintético; 2. comparação dos dados obtidos de um crescimento em um alimento, com as previsões do modelo original, definido na fase 1; 3. ajuste, se necessário, do modelo original, a partir dos resultados obtidos na fase 2.

➤ ***Coleta de dados e análise:*** Os dados podem ser coletados nas diferentes fases do crescimento microbiano: *lag*, exponencial, estacionária e declínio (fig.13). A fase *lag* e a exponencial são as de maior interesse, pois para a maioria dos alimentos a deterioração ocorre antes de os micro-organismos atingirem a fase estacionária. Durante a fase *lag*, as células se encontram em um período de adaptação à nova condição e toda sua síntese metabólica estará voltada para a produção de apenas o essencial para a produção de novas células. Por exemplo, no caso de um estudo para apontar o início da produção de uma toxina, quanto maior for o período da fase *lag*, maior será a vida de prateleira do alimento.

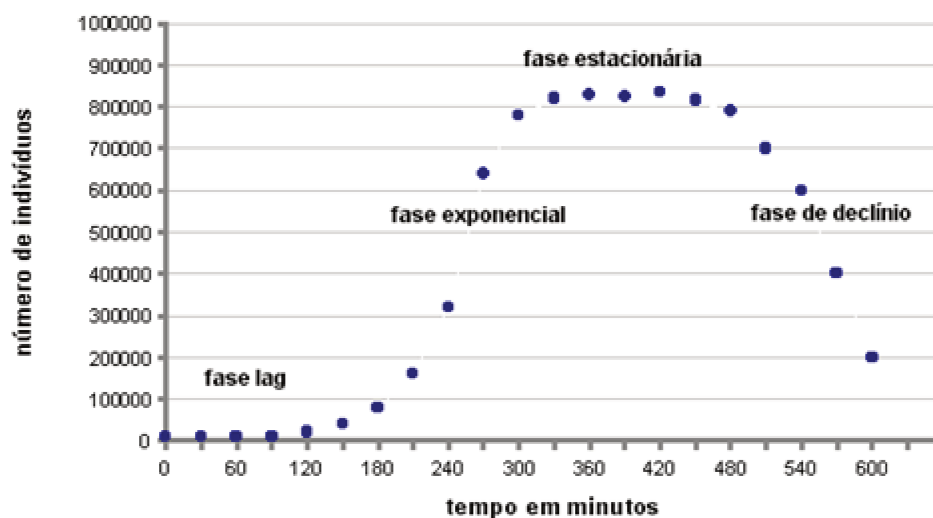


Figura 13. Curva típica de crescimento bacteriano.

A contagem em placa é o método mais utilizado para enumeração de células, com a vantagem que o limite de detecção é inferior a 20 UFC/mL.

➤ **Descrição matemática:** Os modelos matemáticos podem ser classificados em lineares ou não-lineares. Considerando que as derivações de modelos biológicos frequentemente resultam de soluções de equações diferenciais, os modelos de regressão correspondentes são em geral não-lineares. Entende-se por equações diferenciais aquelas que relacionam a variação da variável de resposta com a variação das variáveis independentes, com base na área da teoria envolvida (McMeekin *et al*, 1993).

➤ **Validação:** Independente do quanto um modelo se ajusta ao conjunto de dados que o geraram, seu valor real está baseado no quão bem ele pode prever a variável da resposta, sob condições não testadas especificamente para derivá-lo. Isto significa comparar os dados de comportamento de micro-organismos de interesse, em alimentos submetidos a condições reais de estocagem e distribuição, com valores previstos pelo modelo ajustado (McMeekin *et al*, 1993). Uma forma de se avaliar a qualidade dos modelos preditivos é através do cálculo dos fatores de bias e de exatidão. O fator de bias atesta o quanto os valores preditos

pelo modelo, encontram-se na região denominada segura ou na região insegura da predição. Já o fator de exatidão indica a precisão dos valores preditos pelo modelo em relação aos valores observados (Ross *et al.*, 1996). São utilizados também o valor de R^2 e a relação F_{cal}/F_{tab} .

➤ **Manutenção:** O modelo deve ser avaliado periodicamente por um estatístico, que poderá definir formas mais sensíveis de detecção de desvio (Draper & Smith, 1981).

3.7.2. Níveis dos modelos

Os modelos probabilísticos correspondem a modelos para prever a probabilidade da ocorrência de algum evento, como por exemplo, a probabilidade de ocorrência de toxinas em função de alterações nas variáveis ambientais. Pode-se considerar que os modelos matemáticos estabelecidos para a microbiologia preditiva possuem 3 níveis.

➤ **Primário:** O nível primário corresponde a modelos matemáticos que descrevem a mudança no número de micro-organismos em função do tempo. A produção de uma toxina microbiana também representa um modelo primário (McKellar e Lu, 2004; Nakashima *et al.*, 2000; Whiting e Buchanan, 1997).

➤ **Secundário:** o nível secundário envolve equações que descrevem como as respostas dos modelos primários (duração da fase *lag*, velocidade de crescimento e densidade máxima da população) mudam com alterações nos fatores ambientais (McKellar e Lu, 2004; Nakashima *et al.*, 2000). Modelos secundários assumem que os fatores ambientais são independentes, ou seja, não existe interação entre os fatores (Whiting e Buchanan, 1997).

➤ **Terciário:** é constituído por *softwares* especializados para resolver os modelos primários e secundários (Nakashima *et al.*, 2000). São programas do tipo *user*

friendly, ou seja, com interface de fácil entendimento pelo usuário. Como exemplos desses programas temos o *COMBase Program* e o *Pathogen Modeling Program*.

Fujikawa & Morozumi (2006) propuseram novo modelo logístico para prever o crescimento de *S. aureus* em leite e a produção da enterotoxina em função da variação de temperatura (14 a 36.5°C). Ding e colaboradores (2011) investigaram o efeito combinado da temperatura (15-35°C) e umidade relativa (60-80%) na cinética de crescimento de *S. aureus* em repolho sob condições ambientais simuladas e controladas usando metodologia de superfície de resposta. Os resultados mostraram que tanto a temperatura quanto umidade relativa eram capazes de afetar o crescimento de *S. aureus*, tornando-se ferramenta útil para o desenvolvimento de programas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

Apesar do grande número de trabalhos conduzidos para se avaliar a população máxima do micro-organismo no alimento, poucos avaliam a probabilidade de produção da toxina sob baixas temperaturas. Menor número ainda são os trabalhos que analisam a resposta microbiana em termos de produção da toxina quando levadas em consideração as condições ambientais.

Desta forma, faz-se necessário a compreensão da cinética envolvida na produção de toxinas e na deterioração dos alimentos servidos para crianças. Para tanto, os métodos de microbiologia preditiva têm sido constantemente considerados e aplicados, pois, a partir de combinações e interações entre fatores que possam afetar o crescimento ou desenvolvimento de determinado micro-organismo, bem como sua produção de metabólitos, pode-se criar um modelo matemático que deverá incluir qualquer probabilidade de crescimento do micro-organismo em estudo (ou produção de metabólitos

tóxicos), bem como os parâmetros de crescimento quando este ocorrer em alguma condição específica (López-Malo e Palou, 2000).

Nos últimos anos, o progresso na área da microbiologia preditiva tem sido expressivo e é comumente utilizada como trabalho de rotina de produtores e agências de inspeção de alimentos. A implementação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), análise de risco e instituição de critérios microbiológicos para alimentos, tornou a microbiologia preditiva uma importante ferramenta no gerenciamento de risco ao longo da cadeia alimentícia (Szczawinski, 2012).

O uso de modelos matemáticos por gerentes de segurança e qualidade de alimentos aumentou no sentido de estimar micro-organismos patogênicos em condições de manipulação e processamento de alimentos. Acima de tudo, os modelos são mais valiosos à indústria quando são validados para matrizes alimentares específicas (Tamplin, 2007).

3.7.3. *Microbiologia Preditiva Moderna*

O advento de novas técnicas de detecção de patógenos e seus produtos em alimentos, como o PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), possibilitou encurtar o tempo de análises necessárias em casos de surtos, por exemplo (Alarcón *et al*, 2004). *Primers* específicos para detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas vem sendo descritos desde o início da década de 1990 (Jonhson *et al*, 1991; Wilson *et al*, 1991; Becker *et al*, 1998).

Mais recentemente, a quantificação da expressão dos genes foi possível graças à técnica *Real-Time quantitative* PCR (RT-qPCR; Stessl e Wagner, 2013; Elizaquivel e Aznar, 2008; Elaume e Jabbouri, 2004). Metodologias baseadas em PCR, almejando genes codificadores de SE, têm sido descritas como complemento à detecção direta por métodos imunoenzimáticos, como o ELISA (Stessl e Wagner, 2013).

RT-qPCR é baseado na detecção de um sinal fluorescente derivado de corantes específicos para cDNA (SYBR Green I, por exemplo) ou de sondas específicas, que incluem sondas de hidrólise (TaqMan) ou sondas de hibridização (Elizaquivel e Aznar, 2008).

A expressão de um gene pode ser quantificada relativamente à expressão de um gene, de expressão constitutiva, usado como referência interna (Conlon *et al*, 2002). Esse gene de expressão constitutiva é normalmente chamado de *housekeeping gene*. Dentre outros, o gene 16S rRNA é frequentemente utilizado, com sucesso, em estudos como padrão interno para analisar a expressão de genes alvo (Vaudax *et al*, 2002; Yarwood *et al*, 2002).

As diferentes combinações de fatores ambientais podem afetar a expressão dos genes codificadores de SE ao longo da curva de crescimento bacteriano. A quantificação da expressão dos genes é uma ferramenta útil na compreensão da epidemiologia da doença.

4. REFERÊNCIAS

ASSAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**, v.130, p. 33-40.

AZEVEDO, I.; ALBANO, H.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. (2014) Food safety in the domestic environment. **Food Control**, v.37, p.272-276.

BASSYOUNI, R.H.; EL-SHERBINY, N.; HEFZY, E.H.; WEGDAN, A-A. (2012) Perception of food safety and prevalence of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* species carriers among Fayoum University food handlers. **Life Science Journal**, v.9(4), p.2934-2940.

BECKER, K., ROTH, R. AND PETERS, G. (1998) Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. **J Clin Microbiol** 36, 2548–2553.

BENETT, R. W. (2005). Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in food by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. **Journal of Food Protection**, v.68, p.1264-1270.

BERGDOLL, M.S. (1991). *Staphylococcus aureus*. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 74, p.706-710.

BERGDOLL, M.S. (1989). *Staphylococcus aureus*. In: M.P. Doyle (Ed.) **Foodborne Bacterial Pathogens, Marcel Dekker Inc., New York**, p. 463-523.

BRASIL (2013) Epidemiologic Vigilance of Foodborne Diseases. Disponível em <http://foodsafetybrazil.com/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-2013/>. Acessado em 04.02.2014.

BRASIL (2009). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf. Acesso em: 10 agosto 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2001). Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos em alimentos. Disponível em: http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showact.php?mode=print_version&id=144

BUCHANAN, R.L.; WHITING, R.C. (1996) Risk assessment and predictive microbiology. **Journal of Food Protection**. Vol. sup, pp. 31-36.

BUCHANAN, R.L. (1993a). Developing and distributing userfriendly application software. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, p.251-255.

CAMPOS, A.K.C.; CARDONHA, A.M.S.; PINHEIRO, L.B.G.; FERREIRA, N.R.; AZEVEDO, P.R.M. AND STAMFORD, T.L.M. (2009) Assessment of personal hygiene and practices of food handlers in municipal public schools of Natal, Brazil. **Food Control** v.20, p. 807–810.

CHAPMAN, B.; EVERSLEY, T.; FILION, K.; MACLAURIN, T.; POWELL, D. (2010). Assessment of food safety practices of food service food handlers (risk assessment data): testing a communication intervention (evaluation of tools). **Journal of Food Protection**, v.73, p.1101-1107.

CONLON, K.M., HUMPHREYS, H., O’GARA, J.P. (2002). Regulation of icaR gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. **FEMS Microbiol. Lett.** 216, 171– 177.

COSBY, C.M.; COSTELLO, C.A.; MORRIS, W. C.; HAUGHTON, B.; DEVEREAUX, M. J.; HARTE, F. AND DAVIDSON, P. M. (2009). Microbiological Analysis of Food

Contact Surfaces in Child Care Centers. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 74, n 22, p. 6918-6922.

DE JONG, A.E.I.; VERHOEFF-BAKKENES, L.; NAUTA, M.J.; DE JONGE, R. (2008). Cross-contamination in the kitchen: effect of the hygiene measures. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.615–624.

DICKINSON, B.D, HAVAS, S. (2007). Reducing the population burden of cardiovascular disease by reducing sodium intake: a report of the Council on Science and Public Health. **Archives of Internal Medicine**, v.167, p.1460–1468.

DING, T. WANG, J.; CHOI, N.J.; KIM, H.N.; RAHMAN, S.M.E.; PARK, J.H.; OH, D.H. Development of response surface model to describe the effect of temperature and relative humidity on *Staphylococcus aureus* on cabbage. **In: 7th International Conference 2011 - Predictive Modelling of Food Quality and Safety, 2011, Dublin.: UCD, 2011.** v. 1. p.372-375.

DOYLE, M.E.; GLASS, K.A. (2010). Sodium reduction and its effect on food safety, food quality and human health. **Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, p.44-56.

DRAPER, N.R.; SMITH, H. (1981). Applied regression analysis. **2ed. New York: John Wiley and sons.**

ELEAUME, H.; JABBOURI, S. (2004). Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during in vitro growth. **Journal of Microbiological Methods**, 59, p.363-370.

ELIZAQUIVEL, P.; AZNAR, R. (2008). A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables. **Food Microbiology**, 25, p.705-713.

ETIÉVANT, P., BELLISLE, F., ÉTILÉ, F., PADILLA, M., & ROMON-ROUSSEAU, M. (2012). Food consumption behaviors (in French). In P. Chemineau, & C. Donnars (Eds.), *Choix des consommateurs et politiques nutritionnelles*. Versailles (France): Editions Quae.

FADEL, H.M.; ISMAIL, J. (2009) Prevalence and significance of *Staphylococcus aureus* and *Enterobacteriaceae* species in selected dairy products and handlers. **International Journal of Dairy Science**, 4 (3), p.100-108.

FARBER, J.M. (1986). Predictive modeling of food deterioration and safety. In: Pierson, M.D., Stern, N.J. *Foodborne microorganisms and their toxins*. **New York: Marcel Dekker**, p.57-90.

FUJIKAWA, H.; MOROZUMI, S. (2006). Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. **Food Microbiology**. V. 23, p.260-267.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. (2001). The road map to the Manual. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2^a ed., New York, Berlin: Springer-Verlag, vol. 1, p. 119–166.

GEERAERD, A.H.; VALDRAMIDIS, V.P.; DEVLIEGHERE, F.; BERNAERT, H.; DEBEVERE, J. VAN IMPE, J.F. (2004). Development of a novel approach for secondary modeling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modeling. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.229-244.

GENIGEORGIS, C. (1989) Present state of knowledge on staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 9, p. 327-360.

GORMAN, R.; BLOOMFIELD, S.; ADLEY, C.C. (2002). A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.143-150.

GOTZ, F.; BANNERMAN, T.; SCHLEIFER, K.H. (2006). The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus* **Prokaryotes**, v.4, p.5–75.

GRINSTEAD, D. (2013). Benefits of Food Safety beyond saving lives. In: **International Association for Food Protection**. 30.07.2013.

GRUMANN, D.; NUBEL, U.; BROKER, B.M. 2014. *Staphylococcus aureus* toxins – their functions and genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, v.21, p. 583-592.

HANSEN, J.; HOLM, L.; FREWER, L.; ROBINSON, P.; SANDØE, P. (2003). Beyond the knowledge deficit, recent research into lay and expert attitudes to food risks. **Appetite** v.41, p.111–121.

HAVELAAR, A.H.; BRUL, S.; DE JONG, A.; DE JONGE, R.; ZWIETERING, M.H.; TER KUILE, B.H.. (2010) Future challenges to microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.139, p.S79–S94.

HENNEKINNE, J.A.; DE BUYSER, M.L.; DRAGACCI, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiological Review**, 36, p.815-836.

HUMPHREY, T. J., MARTIN, K.W., SLADER, J., & DURHAM, K. (2001). *Campylobacter* spp. in the kitchen: spread and persistence. **Journal of Applied Microbiology**, 90, p.115S-120S.

JAGANNATH, A.; TSUCHIDO, T. (2003). Predictive microbiology: A Review. **Biocontrol Science**, v.8, n.1, p.1-7.

JARVIS, G. Microorganisms in foods (1988). **Blackwell Scientific Publications**. Versão brasileira. APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos: análise de

perigos e pontos críticos de controle para garantir a qualidade e segurança microbiológica de alimentos (1997). Tradutor D. Ana Terzi Giova, Livraria Varela 377p.

JAY, J. M. Gastreenterite Estafilocócica. In: JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6^a ed., 2005, Porto Alegre: Artmed, cap. 23, p.471-489.

JOHNSON, W.M., TYLER, S.D., EWAN, E.P., ASHTON, F.E., POLLARD, D.R. AND ROZEE, K.R. (1991) Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 29, 426–430.

KAGAN, L.J.; AIELLO, A.E.; LARSON, E. (2002). The role of the home environment in the transmission of infectious diseases. **Journal of Community Health**, v.27, p.247–264.

KIM, N.H.; YUN, A.R.; RHEE, M.S. (2011). Prevalence and classification of toxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from refrigerated ready-to-eat foods (sushi, kimbab and California rolls) in Korea. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, p. 1456-1464.

KITAMOTO, M.; KITO, K.; NIIMI, Y.; SHODA, S.; TAKAMURA, A.; HIRAMATSU, T.; AKASHI, T.; YOKOI, Y. ET AL. (2009). Food poisoning by *Staphylococcus aureus* at a university festival. **Japanese Journal of Infectious Disease**, v.62, p.242–243.

KENNEDY E COLABORADORES (2011). Identification of critical points during domestic food preparation: na observational study. **British Food Journal**, v. 113 (6), p.766-783.

KUSUMANINGRUM, H.D.; RIBOLDI, G.; HAZELEGER, W.C.; BEUMER, R.R. (2003) Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, p.227-236.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W (2001). ***Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins**. In: DOWNES, F. P., ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4a ed. Washington, D. C., cap. 39, p. 387 – 403.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v.2, n.1, p.63-76,.

LOPEZ-MALO, A.; PALOU, E. (2000). Modeling the Growth/No-Growth Interface of *Zygosaccharomyces bailii* in Mango Puree. **Journal of Food Science** V.65, p516–520.

McKELLAR, R.C.; LU, X. (2004) **Modelling microbial responses in food**. Ed.: Boca Raton, CRC Press.

McMEEKIN, T.A.; OLLEY, J.N; ROOS, T. RATKOSWSKY,D.A. (1993) Predictive microbiology: theory and application. **Taunton: Research studies**. P.1-86.

NAKASHIMA, S.M.K.; ANDRÉ, C.D.S.; FRANCO, B.D.G.M. (2000). Revisão: Aspectos básicos da microbiologia preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.3, p. 41-51.

NEMER, R.. (2009). Convivendo com o inimigo - cozinha domiciliar e riscos de contaminação alimentar. **Monografia apresentada ao Centro de Excelência em Turismo (CET) da Universidade de Brasília**. 42p.

OLIVEIRA, A.M.; PADOVANI, C.R.; MIYA, N.T.N.; SANT'ANA, A.S.; PEREIRA, J.L. (2011). High incidence of enterotoxin D producing *Staphylococcus* spp. in Brazilian cow's raw Milk and its relation with coagulase and thermonuclease enzymes. **FoodBorne Pathogens and Diseases**, 8(1), p.159-163.

OLIVEIRA, A.M.; MYIA, N.T.N.; SANT'ANA, A.S.; PEREIRA, J.L. (2010) Behavior and Enterotoxin Production by Coagulase Negative *Staphylococcus* in Cooked Ham, Reconstituted Skimmed Milk, and Confectionery Cream. **Journal of Food Science**, v.75 (7). p.M475-M481.

OMS – Organização Mundial da Saúde (2010). Sixty-Third World Health Assembly. disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/en/>. Acessado em 04.02.2014.

PARK, C.E.; MELO, A.S.; LANDGRAF, M.; HUANG, J.C.; STANKIEWICZ, Z.; RAYMAN, M.K. (1980). A survey of microorganisms for thermonuclease production. **Canadian Journal of Microbiology**, v.26, p.532-535.

PETERSEN, N. J., AND G. K. BRESSLER. (1986). Design and modification of the day care environment. **Reviews of Infectious. Diseases**. V.8, p. 618–621.

POWELL, D.A.; JACOBA, C.J.; CHAPMAN, B.J. (2011). Enhancing food safety culture to reduce rates of foodborne illness. **Food Control** v.22, p.817-822.

REDMOND, E.C.; GRIFFITH, C.J.; SLADER, J.; HUMPHREY, T.J. Microbiological and observational analysis of cross contamination risks during domestic food preparation. **British Food Journal**, v.106 (8), p.581-597. 2004.

ROBERTS, K. R.; BARRETT, B. B.; HOWELLS, A. D.; SHANKLIN, C. W.; PILLING, V. K.; BRANNON, L. (2008). Food safety training and foodservice employees' knowledge and behavior. **Food Protection Trends**, v.28, p.252-260.

RODRIGUES, M.M., BERTIN, B.M.A., ASSIS, L., DUARTE, E.B., AVELAR, A.M.O., PAIXÃO, J.T.S., MATTOS, M.C.; SOUZA, M.M.S. (2004). Rotavirus as potential ethiological agent of a foodborne disease outbreak. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**.v.24 (1), p. 88–93.

ROSS, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, v.81, p.501-508.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T.A. (1991). Predictive microbiology: applications of a square root model. **Food Aust.**, v.43, p.202-207.

ROSSI, E.M.; SCAPIN, D.; TONDO, E.C. (2013). Survival and transfer of microorganisms from kitchen to surface of stainless steel and polyethylene. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.7, p.229-234.

RUSIN, P.; OROSZ-COUGHILIN, P.; GERBA, C. (1998). Reduction of faecal coliform, coliform and heterotrophic plate count bacteria in the household kitchen and bathroom by disinfection with hypochlorite cleaners. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p.819–828.

SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCHMIDT-LORENZ, W. (1990). Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.11, p.1-20.

SCHLEIFER, K.H.; KLOOS, W.E. (1975b). A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.1, p.337-338.

SOARES, L.S.; ALMEIDA, R.C.C.; CERQUEIRA, E.S.; CARVALHO, J.S. NUNES, I.L. (2012). Knowledge, attitudes and practices in food safety and the presence of coagulase-positive staphylococci on hands of food handlers in the schools of Camaçari, Brazil. **Food Control**, v.27, p.206-213.

SOUZA, P.M. and SANTOS, D.A. (2009). Microbiological risk factors associated with food handlers in elementary schools from Brazil. **Journal of Food Safety**, v.29, p.424–429.

STESSL, B.; WAGNER, M. (2013). Real-time PCR detection of FoodBorne pathogenic *Staphylococcus aureus*. **Real-Time PCR in Food Science: Current Technology and Applications**. Ed. David Rodriguez Lázaro, Caister Academic Press.

SZCZAWINSKI, J. (2012). Predictive microbiology: practical applications. **Medycyna Weterynaryjna**, v.68, p.540-543.

TAMPLIN, M.L. (2007). Predictive microbiology research capability. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.62, p.76-77.

TAULO, S.; WETLESEN, A.; ABRAHAMSEN, R.K.; NARVHUS, J.A.; MKAKOSYA, R. (2009) Quantification and variability of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* cross-contamination during serving and consumption of cooked thick porridge in Lungwena rural households, Malawi. **Food Control**, v.20, p.1158-1166.

TRANter, H.S. (1990). Foodborne illness: foodborne staphylococcal illness. **The Lancet**, v.27, p.1044-1046.

TREMAINE, M.T.; BROCKMAN, D.K.; BETLEY, M.J. (1993). Staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression is not affected by the accessory gene regulator (agr). **Infection and Immunity**, 61(1), p.356-359.

VAUDAUX, P., FRANCOIS, P., BISOGNANO, C., KELLEY, W.L., LEW, D.P., SCHRENZEL, J., PROCTOR, R.A., MCNAMARA, P.J., PETERS, G., VON EIFF, C. (2002). Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by hemB mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small colony variant phenotypes. **Infect. Immun.** 70, p. 5428–5437.

VON RHEINBABEN, K. E.; HADLOK, R. M. (1981) Rapid distinction between micrococci and staphylococci with furazolidone agars. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.47, n.1, p. 41-45.

WHITING, R.C. (1997). Microbial database building: what have we learned? **Food Technology**, v.51(4), p.82-86.

WHITING, R.C., BUCHANAN, R.L. (1997). Predictive Modeling. In: **DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. Food microbiology - fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, p.728-739.

WILSON, I.G., COOPER, J.E. AND GILMOUR, A. (1991) Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes entB and entC1 and the thermonuclease gene nuc. **Appl Environmental Microbiol** 57, 1793–1798.

WIRTANEN, G.; SALO, S. (2003). Disinfection in food processing-efficacy testing of disinfectants. **Reviews on Environmental Science Biotechnology**, v.2, p.293–306.

YARWOOD, J.M., MCCORMICK, J.K., PAUSTIAN, M.L., KAPUR, V., SCHLIEVERT, P.M. (2002). Repression of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator in serum and in vivo. **J. Bacteriol.** 184, 1095– 1101.

ZURERA-COSANO, G.; GARCÍA-GIMENO, R.M.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, R.; HERVÁS-MARTÍNEZ, C. (2006). Performance of response surface model for prediction of *Leuconostoc mesenteroides* growth parameters under different experimental conditions. **Food Control**, v.17, p. 429-438.

CAPÍTULO 2

Ocorrência de *Staphylococcus* em alimentos e em superfícies de instalações de cozinhas de creches e residências e avaliação de seu potencial para produção de enterotoxinas

Chaves, R.D.^{1*}; Turatti, M. A.¹; Amaro, E.C.¹; Silva, A.R.^{1,2}; Pereira, J.L.¹

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP – Brasil

²Laboratório de Termobacteriologia (LABTERMO), Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia, Campinas, SP – Brasil

Título curto: *Staphylococcus* e produção de enterotoxinas

***Autor correspondente:** Rafael Djalma Chaves

chaves@fea.unicamp.br

phone: 55 (19) 3521 – 4012

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão para a revista *Food Control*

Esta pesquisa teve como objetivo determinar a ocorrência de possíveis pontos de contaminação por espécies de *Staphylococcus* em instalações de cozinhas institucionais e residenciais. Refeições prontas para o consumo e sobremesas diversas também foram analisadas. Para este fim, 5 pontos diferentes foram amostrados (pia, alça de geladeira, botão de acendimento de fogão, tábua de corte, facas de corte e pano de prato) em quatro creches (visitadas duas vezes) e 10 residências na cidade de Campinas, SP, Brasil. Além disso, foram coletadas 16 amostras de superfícies de mãos e 16 amostras de narinas de manipuladoras de alimentos das creches. Para presença/ausência de *Staphylococcus* foram analisadas carnes de frango e chuchu servidos em horário de almoço nas creches. Sobremesas diversas à base de creme de confeiteiro adquiridas em restaurantes locais foram analisadas para enumeração do patógeno. Após enumeração e detecção, um total de trezentos e vinte colônias, típicas e atípicas para *Staphylococcus*, foram recuperadas e submetidas à identificação fenotípica. Cinquenta e sete isolados foram confirmados como espécies de *Staphylococcus* e conduzidos para ensaio de detecção de enterotoxina. *Staphylococcus aureus* representou a maioria dos isolados identificados (30%) e 10,52 % de todas as linhagens testadas foram capazes de produzir enterotoxinas. A contagem mais elevada para *Staphylococcus* atingiu $3,3 \times 10^4$ UFC/mL na maçaneta da porta de uma geladeira. Os resultados obtidos por esta pesquisa auxiliam no entendimento das fontes de contaminação / contaminação cruzada por este micro-organismo. Além disso, podem auxiliar na implementação de melhorias na limpeza e práticas de manipulação de alimentos em instalações de cozinhas, evitando ou reduzindo a ocorrência de surtos de DVAs.

Palavras-chave: *Staphylococcus*, cozinhas, enterotoxina, manipulação de alimentos, contaminação cruzada.

Highlights

- Enumeração e rastreabilidade de *Staphylococcus* em superfícies de cozinhas
- Enumeração de *Staphylococcus* em sobremesas
- Detecção de enterotoxinas estafilocócicas
- Melhorias na limpeza de superfícies de instalações de cozinhas

1. Introdução

A avaliação da contaminação de superfícies por espécies microbianas sempre foi ponto de preocupação entre os pesquisadores de todo o mundo. De acordo com dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2002), cerca de 2,2 milhões de pessoas morrem a cada ano devido a diarreia causada por água e/ou alimentos contaminados. Desse total, 1,9 milhões são crianças. Em 2001, a OMS lançou o programa "Cinco passos para uma alimentação mais segura", em que cinco ações são recomendadas para evitar a contaminação de alimentos. São eles: manter a limpeza e higiene dos locais de trabalho, separação de alimentos crus e cozidos, cocção adequada dos alimentos, manter os alimentos em temperaturas seguras, uso de água tratada e de matérias-primas de qualidade.

Segundo dados apresentados pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Brasil (Brasil, 2013), de 2000 a 2013, foram relatados 8,857 surtos de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA, envolvendo mais de 163,000 pacientes e pelo menos 112 mortes (dados de 2012-2013 sujeitos a alterações). Embora em números absolutos a maioria dos casos estejam relacionados a adultos, as crianças com menos de 4 anos de idade tem a maior incidência de casos. Os agentes mais comuns em surtos são, em primeiro lugar, *Salmonella* spp. (~40%) e, em seguida, *Staphylococcus* spp. (~20%). Porém acredita-se que os casos envolvendo *Staphylococcus* sejam maiores pois há o problema de sub - notificação devido a curta duração da doença e sintomas mais brandos. Além disso, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA; Brasil, 2001) apenas preconiza a análise de cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivas, apesar cepas coagulase-negativa também serem capazes de produzir enterotoxinas (Oliveira et al , 2011.; Oliveira et al, 2010). De acordo com os dados da ANVISA (Brasil, 2013), as instituições de ensino representam o terceiro local mais comum de ocorrência de surtos de DVA (8%), atrás de residências (40%) e restaurantes (15%) .

Esses dados mostram que as doenças causadas por estes e outros micro-organismos são muito comuns, e a maioria destes surtos poderia ser evitada se houvesse um conhecimento prévio por parte dos responsáveis pela manipulação destes alimentos. Nemer (2009) estudou a limpeza e higiene de nove cozinhas residenciais em Brasília, DF, Brasil. A autora concluiu que existe falta de conhecimento da população em geral sobre

boas práticas de manipulação de alimentos e sobre a relação entre agentes patogênicos de origem alimentar e o acometimento por doenças. A capacidade de *S. aureus*, *Salmonella* e *Campylobacter* de se espalhar a partir de carnes cruas para o ambiente de cozinhas foi verificada por Kennedy e colaboradores (2011). Os resultados mostraram contaminação em todas as fases de preparação, desde as mãos dos manipuladores até os utensílios empregados. *S. aureus* foi o micro-organismo mais comumente encontrado. Redmond e colaboradores (2009) identificaram em uma cozinha doméstica a mesma cepa de *Campylobacter* presente em carne de frango crua e na salada preparada a partir deste frango, evidenciando contaminação cruzada.

Staphylococcus spp. é um micro-organismo patogênico comum no meio ambiente, sendo o homem e outros animais seu principal reservatório. Está presente na cavidade nasal, e a partir deste foco, pode contaminar tanto a epiderme quanto eventuais feridas, seja pelo ar, água, solo, esgoto, ou em qualquer superfície ou objeto que tenha entrado em contato com o homem (Gotz *et al*, 2006).

Desta forma, é necessário um maior entendimento do percurso da contaminação de espécies de *Staphylococcus* em ambientes de preparo de alimentos dirigidos a crianças com idades entre 0-4 anos, bem como a avaliação da anti-sepsia dos manipuladores. Assim, esta pesquisa teve como objetivo investigar focos de contaminação e rastreabilidade de *Staphylococcus* spp. nas instalações de cozinhas institucionais (creches) e residenciais, além de sobremesas baseadas em creme de confeiteiro adquiridas em restaurantes na cidade de Campinas, SP / Brasil.

2. Material e métodos

2.1) Coleta de amostras

Foram visitadas dez residências e quatro creches (duas vezes), na cidade de Campinas, Brasil, para amostragem das instalações e utensílios utilizados nas cozinhas. Foram amostrados assepticamente os seguintes pontos: pia, maçaneta da geladeira, botão de acendimento do fogão, tábua de corte, facas de corte e pano de prato – 8 amostras de cada ponto para creches e 10 amostras para as residências, além de mãos (16 amostras) e narinas (16 amostras) das manipuladoras. Foi elaborado previamente um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) aceito pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp para amostragem das mãos e narinas. Hastes flexíveis estéreis (NaCl

0,85% + água peptonada 0,1%) foram utilizadas para amostragem de todos os pontos, com exceção da tábua de corte (utilizadas esponjas estéreis umidecidas, 50cm²). Quatro utensílios (facas de corte) foram selecionados aleatoriamente para amostragem. Amostras de pano de prato foram acondicionados em sacos estéreis contendo 90mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI, Difco). Alimentos cozidos (carne de frango, n=8 e chuchu, n=8) servidos nas creches, representando o cardápio dos dias das visitas, também foram utilizados para determinar a presença / ausência de *Staphylococcus* spp. Sobremesas a base de creme de confeiteiro de 10 restaurantes também foram enumeradas e caracterizadas. Os alimentos analisados foram pesados (25g) e acondicionados em sacos estéreis. Todas as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Toxinas Microbianas (FEA, Unicamp) em condições de refrigeração (1-6 ° C) e analisadas dentro de 30 minutos.

2.2) Enumeração

As esponjas utilizadas para a amostragem de superfícies, assim como as amostras de pano de prato, foram gentilmente massageados em sacos estéreis contendo 90mL de caldo BHI (Difco). As amostras oriundas das hastes flexíveis foram homegeinizadas com auxílio de agitador de tubos (TE 162, Tecnal). As vinte amostras de sobremesa foram homogeneizadas em sacos estéreis com auxílio de *Stomacher* (Seward Lab System). As enumerações foram realizadas em Baird Parker Agar (BP, Difco) em placa de 10⁰-10⁻³, suplementado com solução de gema de ovo a 5% (p/v) e 1% de solução de telurito de potássio a 1% (p/v) com posterior incubação a 48h/37°C (Lancette e Bennett, 2001).

2.3) Detecção de *Staphylococcus*

Para o enriquecimento das amostras de alimentos (25g) foi utilizado caldo BHI, suplementado com NaCl a 7,5% (Bennet *et al*, 1989), por 48h/37°C, e depois estriados sobre rampas de BP para testes de confirmação (Gram, catalase, susceptibilidade à Furazolidona e DNase) (Lancette e Bennett, 2001).

2.4) Confirmação e identificação

Após o período de incubação (37°C/24-48h), 5 colônias/placa foram escolhidas para realização de testes característicos do gênero (Gram, catalase, coagulase e termonuclease).

Os isolados com características de *Staphylococcus* (positivo para todos os testes e alguns isolados coagulase negativa) foram conduzidos à identificação fenotípica pelo sistema API Staph (bioMérieux), com teste adicional de susceptibilidade ao antibiótico Furazolidona.

2.5) Avaliação da produção de enterotoxina

A capacidade de produção de enterotoxina foi avaliada em caldo BHI. Para tanto, os isolados foram cultivados em 5mL de meio por 37°C/24h. Em seguida, 2mL desta suspensão foram adicionados a 23mL de BHI e incubados a 37°C/48h sob agitação (170 rpm, New Brunswick Scientific, USA) (Chou e Chen, 1997). As culturas foram então centrifugadas a 9000g (DuPont, USA) por 10 min/18°C, de acordo com protocolo de extração (bioMérieux). Posteriormente, 500µL do sobrenadante resultante foram aplicados nos barretes do kit VIDAS SET “*Staph Enterotoxin*” (bioMérieux) para detecção das enterotoxinas SEA, SEB, SEC_{1,2,3}, SED e SEE. A sensibilidade do método é de detecção de 0,05 – 0,1ng de enterotoxina/mL.

2.6) Análise dos resultados

As contagens para cada uma das creches, em cada um dos pontos amostrados foram comparadas estatisticamente para a primeira e segunda visita, utilizando software *BioEstat* versão 5.3. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos, indicando diferenças significativas nas contagens obtidas na primeira e segunda visita.

3. Resultados

3.1) Creches

Cada creche foi visitada duas vezes (intervalo mínimo de 1 mês entre as visitas), com aplicação da mesma metodologia de coleta. Na tabela 1 estão apresentados os logaritmos das contagens das amostras do ambiente e manipuladores, para ambas as visitas, assim como as médias.

Tabela 1. Enumeração de espécies de *Staphylococcus* em instalações de cozinhas institucionais da cidade de Campinas, SP.

<i>Amostras</i> (log UFC/mL ou 50cm ²)	<i>Creche A</i>	<i>Creche B</i>	<i>Creche C</i>	<i>Creche D</i>
Pia (1)*	2,60	-	2,45	-
Pia (2)**	1,85	-	2,28	2,23
média	2,22	-	2,37	1,12
Faca (1)***	2,00	3,68	2,91	3,25
Faca (2)***	-	-	-	-
Média	1,00	1,84	1,45	1,62
Tábua (1)	-	-	3,32	2,60
Tábua (2)	3,23	-	3,60	-
média	1,62	-	3,46	1,30
Geladeira (1)	2,48	3,00	2,35	1,00
Geladeira (2)	-	-	4,52	3,30
Média	1,24	1,50	3,44	2,15
Fogão (1)	2,00	-	-	-
Fogão (2)	2,00	-	-	-
Média	2,00	-	-	-
pano (1)	-	-	3,48	2,93
pano (2)	1,30	-	3,00	3,00
Média	0,65	-	3,24	2,97
Mãos (1)	-	3,03	3,30	-
Mãos (2)	2,08	2,70	1,30	1,78
Média	1,04	2,86	2,30	0,89
Narinas (1)	-	2,30	2,89	-
Narinas (2)	3,04	3,26	2,79	2,04
Média	2,70	2,78	2,84	1,02

*primeira visita; ** segunda visita ***p=0,0008 (análise estatística no apêndice 1), -abaixo do limite de detecção

As médias de contagens mais altas para pia, tábua de corte, porta de geladeira, pano de prato e mãos foram encontradas na creche C. A contagem mais alta alcançada em um ponto único foi na porta da geladeira da creche C (4,52 log₁₀ UFC/mL). O único ponto com redução significativa entre as contagens da primeira e segunda visita foi a faca de corte (p=0,0008).

Estes resultados demonstram a necessidade do melhoramento de boas práticas para limpeza e sanitização de todas as instalações presentes nas cozinhas. Além disso, os altos índices de contaminação encontrados nas superfícies de contato direto com o alimento podem atuar como focos de contaminação, incrementando a contaminação do alimento cru. Sob este enfoque, entre as visitas, foi lecionada uma palestra para todos os manipuladores

de alimentos das instituições, demonstrando a importância das boas práticas de manipulação. Esperava-se com isso uma redução das contagens microbianas em todos os pontos analisados, não apenas das facas de corte.

A figura 1 mostra o perfil de contaminação nas instalações das cozinhas, considerando-se as médias de todas as contagens.

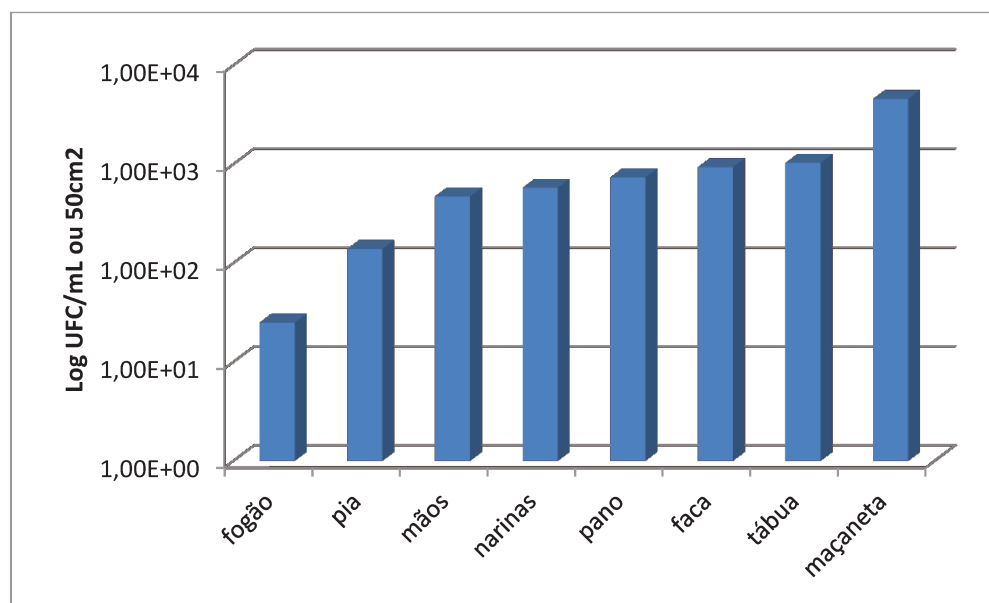


Figura 1. Média das contagens de *Staphylococcus* em cada ponto, considerando-se as 4 creches amostradas.

As médias encontradas nos botões de acionamento dos fogões foram quase zero, e apenas na creche A isolados foram recuperados. Isto se deve provavelmente às colônias de *Staphylococcus* spp. não serem capazes de se desenvolver nas altas temperaturas encontradas próximos ao local amostrado.

No total foram recuperados cinquenta isolados com características típicas de *Staphylococcus* (Cocos Gram (+), catalase (+), coagulase (+/-) e termonuclease (+)). Estes isolados foram submetidos aos testes de identificação bioquímica, com o auxílio do sistema API Staph (bioMérieux), além do teste adicional de resistência à Furazolidona. Entre estes isolados, 3 foram recuperados a partir das refeições analisadas (2 isolados encontrados em carne de frango e 1 isolado encontrado em chuchu) mas nenhuma contagem foi realizada devido à etapa de enriquecimento prévia.

Na tabela 2 está apresentada a correspondência entre os isolados *versus* os pontos analisados.

Tabela 2. **Número de isolados por cada ponto analisado.**

Ponto analisado	Número de isolados
Faca	6
Geladeira	7
Fogão	3
Pia	6
Mãos	7
Pano	5
Tábua	6
Narinas	7

É possível observar que para as mãos, narinas e portas de geladeira foram obtidos 7 isolados por ponto. As pias, tábuas de corte e facas proporcionaram a recuperação de 6 isolados em cada ponto e 3 isolados foram recuperados a partir do botão de acionamento dos fogões. Além das superfícies amostradas, foram identificados 2 isolados provenientes de amostras de frango cozido (*S. epidermidis* e *S. warneri*) e 1 isolado identificado proveniente de amostra de chuchu cozido (*Kokuria kristinae*).

Os isolados identificados em nível de espécie estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. **Identificação fenotípica de isolados recuperados de instalações de cozinhas institucionais.**

Isolado	Creche	Identificação	% de convergência (API Staph)
I1 faca	B	<i>S.epidermidis</i>	98
I2 faca	D	<i>S.aureus</i>	78
I3 faca	C	<i>S.xylosus</i>	99.8
I4 faca	A	<i>S.warnei</i>	97
I5/I6 faca	B, B	<i>S.hominis</i>	85
I7 geladeira	C	<i>S.xylosus</i>	98
I8 geladeira	A	<i>S.cohnii ssp.cohnii</i>	74
I9/I10 geladeira	A, B	<i>S.epidermidis</i>	98
I11/I12/I13geladeira	B, B, C	<i>S.aureus</i>	97
I14 fogão	D	<i>S.chromogenes</i>	94
I15/I16 fogão	B, C	<i>S.epiermidis</i>	97
I17 narinas	B	<i>S.epidermidis</i>	95
I18 narinas	A	<i>S.caprae</i>	99.9
I19/I20/I21/I22/I23narinas	B, B, C, C, D	<i>S.aureus</i>	97
I24 pia	C	<i>S.aureus</i>	87
I25/I26 pia	A, C	<i>S.xylosus</i>	99.8
I27/I28/I29 pia	B, B, B	<i>S.warneri</i>	90
I30/I31 mãos	C, C	<i>S.aureus</i>	86
I32 mãos	B	<i>S.epidermidis</i>	98
I33 mãos	D	<i>S.warneri</i>	95
I34 mãos	C	<i>S.sciuri</i>	89
I35/I36 mãos	A, C	<i>S.xylosus</i>	99
I37 pano de prato	B	<i>S.warneri</i>	97
I38/I39 pano de prato	C, D	<i>S.aureus</i>	87
I40/I41 pano de prato	A, C	<i>S.xylosus</i>	99.8
I42/I43 tábua	C, C	<i>S.lentus</i>	99.9
I44 tábua	B	<i>S.hominis</i>	62
I45 tábua	D	<i>S.capitis</i>	50
I46 tábua	C	<i>S.epidermidis</i>	97
I47 tábua	A	<i>S.aureus</i>	98
I48 frango	A	<i>S. epidermidis</i>	98
I49 frango	D	<i>S. warneri</i>	70
I50 chuchu	C	<i>Kokuria kristinae</i>	99.9

De acordo com a identificação dos isolados, um perfil de incidência foi traçado. Os resultados estão expressos na tabela 4. Analisando estes dados é possível observar que *S. aureus* e *S. epidermidis* são as espécies mais frequentes com 30 e 20% de ocorrência, respectivamente. Estas espécies são capazes de causar intoxicação e consequente enfermidade (Vasil, 2011; Oliveira *et al*, 2010; Zell *et al*, 2008; Balaban e Rasooly, 2000).

Tabela 4. **Perfil de incidência de acordo com as espécies de *Staphylococcus*.**

Espécies	% (aprox.)
<i>S. aureus</i>	30
<i>S. epidermidis</i>	20
<i>S. xylosus</i>	16
<i>S. warneri</i>	12
<i>S. hominis</i>	6
<i>S. lentus</i>	4
<i>S. capitis</i>	2
<i>S. caprae</i>	2
<i>S. chromogenes</i>	2
<i>S. cohnii</i>	2
<i>S. sciuri</i>	2
<i>Kokuria kristinae</i>	2

3.2) Cozinhas residenciais

Dez cozinhas residenciais foram analisadas e 5 pontos amostrados (pia, faca de corte, tábua de corte, porta da geladeira e botão de acionamento do fogão). Na tabela 5 está apresentado o logaritmo das contagens para cada ponto.

Tabela 5. **Logaritmo das contagens realizadas em instalações de cozinhas residenciais na cidade de Campinas, SP.**

Amostra (log UFC/mL ou 50cm²)	A	D	E	F
Botão fogão	1	<1*	1,48	<1
Maçaneta geladeira	1	1	1,40	2,76
Faca	2,15	<1	<1	<1
Pia	1	<1	<1	2,06
Tábua	1,30	<1	1,18	<1

* contagens abaixo do limite de detecção. Seis residências também não obtiveram contagens em nenhum ponto.

Em geral, as amostras coletadas nas cozinhas residenciais mostraram contagens muito baixas, ou abaixo do limite de detecção. Apenas uma residência (A) obteve contagens em todos os pontos analisados. Contudo, a contagem mais alta foi encontrada na porta da geladeira da residência F (2,76Log₁₀ UFC/mL).

Dez isolados foram submetidos para identificação morfológica e bioquímica. Destes, apenas 3 possuíam características de *Staphylococcus*. As espécies identificadas

foram *S. sciuri* e *S. lentus* (89,3 e 95,5% respectivamente, isoladas de tábua de corte) e *S. cohnii* spp *cohnii* (86,3%, isolado da maçaneta da porta de geladeira). Os 3 isolados foram coagulase negativa.

3.3) Sobremesas

As contagens obtidas das sobremesas adquiridas em restaurantes locais estão apresentadas na tabela 6. Deste total, 4 amostras apresentaram isolados com características estafilocócicas e foram identificados pelo sistema API Staph: *S. capitis* (93,7%, isolado de sonho), *S. xylosus* e 2 *S. aureus* (99,8% e 88,5% respectivamente), isolados de torta holandesa.

Tabela 6. Logaritmo das contagens obtidas das sobremesas prontas para o consumo.

Restaurante	Sobremesa	Log UFC/g	Espécie (% API)
1	Bomba de chocolate	3,60	<i>S. capitis</i> (93,7%)
	Sonho	3,54	
2	Bomba de chocolate	3,76	
	Torta de morango	2,30	
3	Torta holandesa	5,03	<i>S. aureus</i> (88,5%)
	Torta de amendoim	0,00	
4	Bomba de chocolate	3,70	
	Torta de morango	4,43	
5	Truffa	3,16	
	<i>Donut</i>	0,00	
6	<i>Cheesecake</i>	0,00	<i>S. aureus</i> (88,5%)
	Torta holandesa	4,29	
7	Pavê	2,30	
	Torta de morango	2,00	
8	Torta holandesa	5,01	<i>S. xylosus</i> (99,8%)
	Bomba de chocolate	0,00	
9	Pastel de nata	6,38	
	Torta holandesa	3,13	
10	Torta holandesa	4,56	
	Torta alemã	4,74	

Das 20 amostras analisadas, 9 (45%, amostras apresentadas em negrito) apresentaram contagens superiores a $4\log_{10}\text{UFC/g}$. Populações com esse nível de contaminação são passíveis de produzir enterotoxinas (Meyrand *et al*, 1998).

3.4) Produção de enterotoxina

Todos os isolados confirmados como *Staphylococcus* spp. foram submetidos ao teste de detecção de produção de enterotoxina. Dos 57 isolados (creches, residências, alimentos servidos nas creches e sobremesas), 6 demonstraram capacidade para produção de enterotoxina (10,52%), e todos eles foram recuperados de instalações das cozinhas das creches. Quanto à enzima coagulase, 3 isolados eram coagulase positiva e 3 coagulase negativa. Na tabela 7 está apresentada a origem e identificação de cada isolado.

Tabela 7. Isolados produtores de enterotoxina recuperados das instalações de cozinhas institucionais.

Espécie	Local de isolamento
<i>S. aureus</i>	Mãos (creche C)
<i>S.xylosus</i>	Mãos (creche C)
<i>S.aureus</i>	Narinas (creche B)
<i>S.epidermidis</i>	Narinas (creche B)
<i>S.xylosus</i>	Pano de prato (creche C)
<i>S. aureus</i>	Tábua de corte (creche C)

4. Discussão

O objetivo desta pesquisa foi determinar a ocorrência de possíveis pontos de contaminação por espécies de *Staphylococcus* em instalações de cozinhas institucionais e residenciais cidade de Campinas, SP/Brasil. Refeições prontas para o consumo e servidas na hora do almoço em creches também foram analisadas. Os resultados evidenciaram altas contagens de *Staphylococcus* spp., especialmente nas cozinhas das creches (contagens acima de 10^4UFC/mL , como na maçaneta da porta de geladeira). Estes dados são de extrema importância, uma vez que crianças entre 0-4 anos estão entre a parcela da população mais susceptível a Doenças Veiculadas por Alimentos. Além disso, as residências são responsáveis por quase metade dos surtos relacionados a alimentos no Brasil, apesar de no presente trabalho as contagens terem sido baixas.

Esta pesquisa também teve como escopo analisar alimentos prontos para o consumo. As escolhas dos alimentos para a realização das amostragens foram baseadas na porcentagem de surtos relacionados (Brasil, 2013; Brasil, 2012). Sobremesas baseadas em creme de confeiteiro, ovos e laticínios respondem a 15% dos casos confirmados de surtos relacionados a DVAs. Apesar de o número de casos envolvendo carne de frango ser ligeiramente menor do que os casos envolvendo carne bovina (2,5 e 3,8% respectivamente), carnes de aves são consideravelmente mais baratas do que outros tipos de carnes no Brasil. Provavelmente, esta é a razão pela qual carne de frango é frequentemente servida em restaurantes institucionais, e foi esta a razão pela qual foi escolhida para objeto de estudo.

A presença/ausência de *Staphylococcus* spp. foi avaliada em carne de frango e chuchu servidos na hora do almoço das creches visitadas e enumerações do patógeno também foram realizadas em sobremesas à base de creme de confeiteiro.

A presença da bactéria nas amostras oriundas dos alimentos servidos nas creches indica provável contaminação cruzada, uma vez que este organismo é termossensível e um cozimento adequado iria eliminá-lo. Esta hipótese é suportada pelas altas contagens encontradas nas portas de geladeira, facas de corte e tábuas de corte. Estes dados estão de acordo com o encontrado por Jackson e colaboradores (2007), que mostraram uma significativa contaminação por patógenos em refrigeradores domésticos (*S. aureus* recuperado de 6.4% dos refrigeradores analisados). Portanto, é possível ocorrer uma contaminação cruzada a partir das geladeiras para o alimento. Em adição, pode-se ainda observar a falta de boas práticas de manipulação e antisepsia, uma vez que contagens de até 10^3 UFC foram encontradas nas mãos e narinas dos manipuladores.

No que diz respeito à identificação dos isolados, *S. aureus* foi recuperado de cada ponto analisado. Além disso, esta pesquisa mostrou que maçanetas de portas de geladeiras, facas e tábuas de corte podem ser consideradas como pontos críticos de contaminação por espécies de *Staphylococcus* (não somente *S. aureus*).

As enumerações de *Staphylococcus* spp. nas sobremesas alcançaram contagens de até 10^6 UFC/g. Este dado é preocupante, pois sobremesas à base de creme de confeiteiro são muito comuns no Brasil e a maioria da população tem o hábito de consumi-las. Além disso, em níveis de contaminação a partir de 10^4 UFC/g ou mL, *Staphylococcus* spp. se torna capaz de produzir enterotoxinas (Tatini *et al*, 1971; Gomez-Lucia *et al*, 1986).

Além disso, esta pesquisa também tinha por objetivo reduzir os níveis de contaminação através da apresentação de uma palestra intitulada “Boas práticas de manipulação de alimentos”, ministrada para todas as creches visitadas. Uma apresentação em *PowerPoint* foi dada entre as visitas 1 e 2, direcionadas para toda a equipe envolvida no preparo de alimentos. De posse dos resultados das enumerações obtidas antes e após a palestra, o teste de Wilcoxon foi aplicado para verificar se a redução das contagens seria significativa. Quando comparamos os resultados de enumerações das creches entre si, não há uma redução significativa das contagens de *Staphylococcus* entre as visitas 1 e 2. Infelizmente, apenas 1 ponto analisado teve redução significativa ($p < 0,05$). Contagens obtidas das segundas visitas nas facas de corte foram significativamente menores, com valor de $p = 0,0008$.

A limpeza dos ambientes e utensílios encontrados nas cozinhas das creches é feita apenas com água e detergente (dados informados pela própria equipe responsável pelo preparo dos alimentos). Foi sugerido o uso de agentes com poder microbiocida, como álcool 70° em superfícies de contato com alimentos e antisepsia dos manipuladores, além de solução de hipoclorito de sódio a 10% para sanitização de áreas maiores. Medrano-Felix e colaboradores (2010) reportam redução significativa da contagem de *Staphylococcus aureus* em cozinhas residenciais ao longo de 4 semanas, quando utilizado solução de hipoclorito de sódio a 5%.

Enumerações realizadas nas instalações das cozinhas residenciais indicaram baixa recuperação. Apenas duas, das 10 residências, obtiveram contagens de até 10^2 UFC (faca, residência A; maçaneta de porta de geladeira e pia, residência F). A maioria dos pontos analisados estava abaixo dos limites de detecção. Uma hipótese sobre estes números baixos é baseada no fato de todas as residências visitadas terem como moradores estudantes do curso de Engenharia de Alimentos, com conhecimento prévio nas boas práticas de manipulação (Uggioni e Salay, 2012).

As espécies identificadas predominantemente foram *S. aureus* (30%), *S. epidermidis* (20%) e *S. xylosum* (16%), todos potenciais produtores de enterotoxinas (Bathia & Zahoor, 2007). Seis isolados recuperados das instalações de cozinhas institucionais foram capazes de produzir enterotoxina *in vitro*, sendo 3 coagulase-negativa (*S. xylosum* $n=2$, *S. epidermidis* $n=1$) e 3 coagulase-positiva (*S. aureus* $n=3$). Estes resultados corroboram

pesquisas desenvolvidas previamente em relação à produção de enterotoxina por cepas coagulase-negativa (Oliveira *et al*, 2011, Oliveira *et al*, 2010). Além disso, mostra que são necessárias mudanças na legislação vigente para análise de estafilococos produtores de enterotoxinas.

Estes dados podem ajudar manipuladores de alimentos a identificar pontos críticos de contaminação em seu ambiente de trabalho (creches, por exemplo) e em suas casas, melhorando a higienização destes locais. Em adição, esses resultados abrem caminho para trabalhos futuros, envolvendo microbiologia preditiva e análise de risco, considerando os limites críticos para produção de enterotoxinas por espécies de *Staphylococcus*.

5. Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a todos que participaram das coletas realizadas nas creches e residências, ao Dr. Alessandro Farias pelo suporte estatístico, ao Espaço da Escrita (Unicamp) pela revisão do artigo para o idioma inglês e ao CNPq pelo suporte financeiro.

6. Referências

BATHIA, A.; ZAHOOOR, S. (2007). Staphylococcus aureus enterotoxins: a review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.3, p.188-197.

BENNET, R.W.; ASH, M.; ATRACHE, V. (1989). Visual screening with enzyme immunoassay for staphylococcal enterotoxins in foods: An interlaboratory study. **AOAC Abstracts**. 72.

BRASIL (2013) Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmitidas por Alimentos. Disponível em <http://foodsafetybrazil.com/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-2013/>

BRASIL (2009). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Resolução - SVS. 2009b. Disponível em: [HTTP://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf).

BRASIL, (2013). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. ANVISA. Análise epidemiológica de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES

CHOU, C-C.; CHEN, L-F.; (1997) Enterotoxin Production by *Staphylococcus warneri* CCRC 12929, a Coagulase-Negative strain. *Journal of Food Protection*, 8,883-1012.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. (2005). Microbiologia dos alimentos. 2. ed. São Paulo: Atheneu,

GOMEZ-LUCIA, E.; BLANCO, J.L.; GOYACHE, J.; DE LA FUENTE, R.; VASQUEZ, Y.A. (1986) Growth and enterotoxin A production by *Staphylococcus aureus* S6 in Manchego type cheese. **Journal of Applied Bacteriology**, 61, 499-503.

GORMAN, R.; BLOOMFIELD, S.; ADLEY, C.C. (2002). A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.143-150.

GOTZ, F.; BANNERMAN, T.; SCHLEIFER, K.H. (2006). The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus* **Prokaryotes**, v.4, p.5–75.

JACKSON, V. ET AL. (2007). The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. **Food Control**, v.18, p.346-351.

KENNEDY, J. ET AL. (2011). Identification of critical points during domestic food preparation: an observational study. **British Food Journal**, v. 113 (6), p.766-783.

LANCETTE, G.A., BENNETT, R.W. (2001). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4th edition, chapter 39, p. 387-403.

MEDRANO-FELIX, A.; MARTINEZ, C.; CASTRO DEL CAMPO, N.; LEON-FELIX, J.; PERZA-GARAY, F.; GERBA, C.P.; CHAIDEZ, C. (2010). Impact of prescribed cleaning and disinfectant use on microbial contamination in the home. **Journal of Applied Microbiology**, v.110, p.463-471.

MEYRAND, A; ET AL. (1998). Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.537-544.

NEMER, R. (2009). Convivendo com o inimigo - cozinha domiciliar e riscos de contaminação alimentar. **Monografia apresentada ao Centro de Excelência em Turismo (CET) da Universidade de Brasília**. 42p.

OLIVEIRA, A.M.; MIYA, N.T.N.; SANT'ANA, A.S.; PEREIRA, J.L. (2010). Behavior and enterotoxin production by coagulase negative *Staphylococcus* in cooked ham, reconstituted skimmed milk and confectionery cream. **Journal of Food Science**, 75, M475-M481.

OLIVEIRA, A.M.; PADOVANI, C.R.; MIYA, N.T.N.; SANT'ANA, A.S.; PEREIRA, J.L. (2011). High incidence of enterotoxin D producing *Staphylococcus* spp. in Brazilian cow's raw Milk and its relation with coagulase and thermonuclease enzymes. **Food Borne Pathogens and Diseases**, 8(1), 159-163.

REDMOND, E.C.; GRIFFITH, C.J. (2009). Microbiological and observational analysis of cross-contamination risks during domestic food preparation. **British Food Journal**, 106(8), 581-597.

RUSIN, P.; OROSZ-COUGHILIN; GERBA, C. (1998). Reduction of faecal coliform, coliform and heterotrophic plate count bacteria in the household kitchen and bathroom by disinfection with hypochlorite cleaners. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p.819-828.

TATINI, S.R.; JEZESKI, J.J.; MORRIS, H.A.; OLSON, J.C.; CASMAN, E.P. (1971). Production of staphylococcal enterotoxin A in Cheddar and Colby cheeses. **Journal of Dairy Science**, 54, 815-825.

UGGIONI, P.L.; SALAY, E. (2012). Consumer knowledge concerning safe handling practices to prevent microbiological contamination in commercial restaurants and socio-demographic characteristics, Campinas/SP/Brazil. **Food Control**, 26, p.331-336.

VASIL, M. 2011. *Staphylococcus* spp. isolated from cow's Milk – occurrence and production of enterotoxins. **Journal Veterinarska Stanica**, v.42, p.132-138.

CAPÍTULO 3

Modelagem secundária do tempo para detecção de Enterotoxina Estafilocócica A (SEA) em carne de frango em função da temperatura

Chaves, R.D.^{1*}, Silva, A.R.^{1,2}, Alvarenga, V.O.¹, Pereira, J.L.¹

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP – Brasil

²LABTERMO, Fundação André Tosello, Campinas, SP - Brasil

Título curto: Modelagem de Enterotoxina Estafilocócica A em carne de frango

***Autor correspondente:** Rafael D. Chaves mail: chaves@fea.unicamp.br

Fone: 55 (19) 3521 – 4012

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão para a revista *Journal of Applied Microbiology*

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo modelar o Tempo para Produção de Toxina (TPT) em carne de frango em função da temperatura usando um modelo polinomial de superfície de resposta. Para tanto, a linhagem padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, produtora de Enterotoxina Estafilocócica A (SEA) foi inoculada na carne de frango, esterilizada previamente a 121°C/15min. Porções de 25g foram devidamente preparados mediante ajuste de pH e concentração de sal e alocadas a diferentes temperaturas de armazenamento de acordo com as combinações obtidas pelo planejamento experimental. Em intervalos de tempo, que variaram de 1 a 24h, as amostras de frango foram coletadas e submetidas ao protocolo de extração e detecção de SE (miniVIDAS, bioMérieux). Os dados da modelagem primária permitiram analisar a influência das variáveis sobre o prolongamento do TPT e com suas respostas foi possível analisar as variáveis que impactaram significativamente o TPT. O menor tempo de detecção averiguado foi de 4h e foi significativamente influenciado pelos efeitos da temperatura linear e quadrática. O modelo obtido teve predição aceitável para TPT ($R^2 = 0,83$). Este modelo poderá ser utilizado por microbiologistas para cálculo do TPT em função de variações na temperatura de armazenamento, incrementando a segurança alimentar.

Palavras-chave: Tempo para Produção de Toxinas, Enterotoxina Estafilocócica (SE), frango, modelagem polinomial.

1. Introdução

Algumas linhagens de *Staphylococcus* são patogênicas e capazes de produzir enterotoxinas quando condições favoráveis estão presentes. Enterotoxinas Estafilocócicas (SEs) quando ingeridas podem provocar quadros de dores de cabeça, febre, emese e diarreia (Gotz *et al*, 2006). Estes micro-organismos conseguem se desenvolver em uma ampla faixa de condições ambientais. A temperatura ótima para produção de SE é ligeiramente maior que a temperatura ótima de crescimento da célula vegetativa. No que diz respeito à atividade de água, ocorre crescimento a 0,83 porém só há produção de SE em valores acima de 0,85. Além disso, *Staphylococcus* conseguem se desenvolver em ambientes com concentrações de NaCl de até 20% (Gotz *et al*, 2006).

As células vegetativas de *Staphylococcus* são altamente susceptíveis a tratamentos térmicos e sanitizantes, porém as SEs possuem resistência a altas temperaturas, congelamento e secagem, além de resistência a enzimas proteolíticas do trato digestório (Bergdoll, 1989). Além disso, *Staphylococcus* é considerado fraco competidor com outras bactérias, e sua presença em alimentos prontos para o consumo pode indicar recontaminação, ou contaminação cruzada (Troller e Frazier, 1963).

A intoxicação alimentar causada por SEs é frequentemente associada a cepas coagulase-positivas, apesar de haver casos documentados de surtos relacionados a cepas coagulase-negativas (Bergdoll, 1989, Oliveira *et al*, 2010). As SEs são geralmente formadas no fim da fase exponencial de crescimento ou início da fase estacionária (Hennekinne *et al*, 2012). A exceção é feita a SEA, formada no meio da fase exponencial (Tremaine *et al*, 1993). A intoxicação ocorre quando alimentos contaminados com o patógeno são expostos a condições favoráveis de crescimento da bactéria e posteriormente consumidos.

Apesar do grande número de estudos conduzidos para se avaliar a cinética de crescimento e população máxima de *Staphylococcus* em matrizes alimentares (Troller, 1971; Notermans *et al*, 1983; Ding, *et al*, 2011; Rosengren *et al*, 2013), poucos analisaram a resposta em termos de produção de toxina levando-se em conta fatores ambientais (Schelin *et al*, 2011; Min *et al*, 2013), principalmente aqueles relacionados à temperaturas de conservação e abuso de refrigeração. O crescimento bacteriano e a

produção de SE podem estar dissociados, e o comportamento do micro-organismo em matrizes alimentares pode variar muito em relação a meios de cultura (Schelin *et al*, 2011).

Pesquisadores têm a disposição diferentes métodos de análise para detecção de toxinas, ensaios imuno enzimáticos tradicionais (ELISA) e ensaios automatizados, como o sistema miniVIDAS (bioMérieux, França) ou detecção dos genes codificadores de SE, como as diferentes análises moleculares (PCR, PCR em Tempo Real). O sistema miniVIDAS baseia-se na ligação de anticorpos fluorescentes específicos adsorvidos na parede interna de ponteiras e leitura do espectro de onda em 450nm. Os resultados para detecção de 7 SEs (SEA, SEB, SEC_{1,2,3}, SED e SEE), são expressos de acordo com o Valor de Teste (VT) encontrado. O cálculo de VT é feito automaticamente pelo sistema, sendo correspondente ao valor do sobrenadante dividido pelo valor de fluorescência padrão, sendo o resultado expresso como positivo ($VT \geq 0,13$) ou negativo ($VT < 0,13$).

Modelos preditivos são ferramentas úteis baseadas na descrição das mudanças envolvendo o número de células de um determinado micro-organismo, ou a quantidade de toxinas que porventura possam ser produzidas em função do tempo (modelos primários, Castillejo-Rodriguez *et al*, 2002). Modelos secundários descrevem como as respostas do modelo primário são afetadas por efeitos de fatores ambientais, tais como temperatura, pH e atividade de água. Os modelos terciários são baseados em *softwares* do tipo *user friendly* para análise de dados coletados.

Dado o exposto acima, esta pesquisa teve como objetivos avaliar a capacidade de produção de SE de isolados de *Staphylococcus* em carne de frango preparada em condições diversas de temperatura de resfriamento/estocagem e concentração de NaCl.

2. Material e métodos

2.1. Inóculo

Foi utilizado 1 isolado produtor de SEA (*S. aureus* ATCC 13 565). As linhagens obtidas das cozinhas tiveram sua capacidade de produção de SE em meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco, EUA) previamente verificadas (artigo 1) porém não foram capazes de produzir toxinas no alimento. As culturas produtoras de SEA foram cultivadas em BHI caldo (18h/37°C±1). As suspensões foram padronizadas em 10⁸ UFC/mL

(Densimat, bioMérieux, França) e diluídas a uma concentração final de 10^3 - 10^4 UFC/mL para inóculo na carne de frango.

2.2. *Preparo das amostras*

Amostras de peito de frango cruas (pH 6,0, A_a 0,99) foram adquiridas em mercados locais e imediatamente levadas ao Laboratório de Toxinas Microbianas (FEA, Unicamp). A carne foi então fracionada em pequenos pedaços os quais foram distribuídos igualmente em frascos do tipo *Schott* (25g). Para eliminar possíveis contaminantes presentes na amostra, os frascos, já com as amostras, foram esterilizados em autoclave a 121°C/15min. Diferentes concentrações de NaCl e pH (ajustado após esterilização com soluções estéreis de NaOH 1N ou Ácido Tartárico 1N, pHmetro mPA210 MS TECNOPON) obtidas a partir de 3 desenhos experimentais, foram adicionadas aos frascos, juntamente com 25mL de água destilada.

2.3. *Desenho experimental*

Foram utilizados, como *screening*, 2 planejamentos do tipo Central Composto não fatorial, sendo o primeiro com temperaturas mais elevadas (simulando temperaturas encontradas nas cozinhas institucionais) e o segundo com temperaturas mais baixas, simulando temperaturas de abuso de refrigeração. As variáveis escolhidas para os perfis de altas temperaturas foram: temperatura (14, 20, 30, 40 e 46°C $\pm$ 1), pH (5.3, 5.5, 6.0, 6.5 e 6.7, faixa de variação detectada na carne de frango) e concentração de NaCl (0.8, 1.0, 1.5, 2.0 e 2.2; concentrações praticadas na indústria de alimentos para produtos de carne de frango, tabela 2). As concentrações de NaCl foram escolhidas de acordo com praticado na indústria para produtos prontos para o consumo. As variáveis escolhidas para os perfis de temperaturas de refrigeração e abuso foram: temperatura (3, 5, 10, 15 e 17°C $\pm$ 1) e concentração de NaCl (0.8, 1.0, 1.5, 2.0 e 2.2%; tabela 3).

Tabela 2. *Screening* para estudo do efeito da temperatura, pH e concentração de NaCl na produção de SE, em altas temperaturas.

<i>Ensaio</i>	<i>Valores codificados</i>			<i>Valores reais</i>			<i>Intervalo para coleta (h)</i>
	<i>Temperatura</i>	<i>pH</i>	<i>Sal</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Sal (%)</i>	
1	-1	-1	-1	20	5,5	1	8
2	+1	-1	-1	40	5,5	1	8
3	-1	+1	-1	20	6,5	1	8
4	+1	+1	-1	40	6,5	1	8
5	-1	-1	+1	20	5,5	2	8
6	+1	-1	+1	40	5,5	2	8
7	-1	+1	+1	20	6,5	2	8
8	+1	+1	+1	40	6,5	2	8
9	0	0	0	30	6,0	1,5	8
10	0	0	0	30	6,0	1,5	8
11	0	0	0	30	6,0	1,5	8
12	-1,69	0	0	13,9	6,0	1,5	8
13	+1,69	0	0	46,1	6,0	1,5	8
14	0	-1,69	0	30	5,3	1,5	8
15	0	+1,69	0	30	6,7	1,5	8
16	0	0	-1,69	30	6,0	0,8	8
17	0	0	+1,69	30	6,0	2,3	8

Tabela 3. *Screening* para estudo do efeito da temperatura e concentração de NaCl na produção de SE, simulando abuso de temperatura de refrigeração.

<i>Ensaio</i>	<i>Valores codificados</i>		<i>Valores experimentais</i>		<i>Intervalo para coleta (h)</i>
	<i>Temperatura</i>	<i>Sal</i>	<i>Temperatura(°C)</i>	<i>Sal (%)</i>	
1	-1	-1	5	1	24
2	+1	-1	15	1	12
3	-1	+1	5	2	24
4	+1	+1	15	2	12
5	0	0	10	1,5	24
6	0	0	10	1,5	24
7	0	0	10	1,5	24
8	-1,41	0	3	1,5	24
9	+1,41	0	17	1,5	8
10	0	-1,41	10	0,8	24
11	0	+1,41	10	2,2	24

O terceiro planejamento foi estabelecido considerando temperaturas de abuso de refrigeração e temperaturas altas que podem ocorrer em ambientes de cozinhas institucionais, já que essa variável, reconhecidamente, representa a barreira mais significativa sobre os parâmetros de crescimento microbiano. Além disso, para a construção

do modelo de superfície de resposta também foi considerado o efeito adicional de inibição ou retardamento do TPT que a variável NaCl poderia ter quando em conjunto com a temperatura. Sendo assim, os limites das variáveis foram os seguintes: temperatura (15, 19, 28, 37 e 41°C±1) e concentração de NaCl (0,5; 0,8; 1; 1,3 e 1,5; tabela 4).

Tabela 4. Desenho Composto Central, não fatorial, para perfis de baixas e altas temperaturas.

<i>Ensaio</i>	<i>Valores codificados</i>		<i>Valores experimentais</i>		<i>Intervalo para coleta (h)</i>
	<i>Temperatura</i>	<i>Sal</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Sal (%)</i>	
1	-1	-1	19	0,8	4
2	+1	-1	37	0,8	1
3	-1	+1	19	1,3	4
4	+1	+1	37	1,3	1
5	0	0	28	1	4
6	0	0	28	1	4
7	0	0	28	1	4
8	-1,41	0	15,3	1	24
9	+1,41	0	40,7	1	1
10	0	-1,41	28	0,5	4
11	0	+1,41	28	1,5	4

2.4. Análise dos resultados

Os resultados foram acompanhados mediante coleta em intervalos de tempo que mudaram em função dos experimentos e consistiram no acompanhamento da variação da população em função do tempo e na avaliação do tempo para produção / não produção de toxina.

a. Modelagem primária:

Para modelagem primária foram utilizados os dados do acompanhamento da variação da população (UFC/mL) em função do tempo (h). As enumerações da população de *S. aureus* foram realizadas em Baird-Parker Agar (37°C/24h, BP, Difco, EUA). Essas enumerações foram acompanhadas por, no máximo, 144h, período no qual todas as curvas já tinham entrado na fase estacionária do crescimento. Para cada ensaio foi gerada uma curva de crescimento correlacionando população vs tempo e o TPT. Simultaneamente às enumerações, foi realizada a detecção de toxina para cada intervalo de tempo descrito nas tabelas 2, 3 e 4. A detecção da toxina foi realizada utilizando o protocolo de extração e

detecção de enterotoxinas (miniVIDAS Staph Enterotoxin II, bioMérieux, França). A produção de SE foi avaliada por até 144h, já que esse foi o maior TPT nas condições testadas.

Com os resultados da modelagem primária foi possível verificar qual variável tinha maior efeito como barreira sobre o TPT.

b. Modelagem secundária:

Os dados de TPT para cada ensaio testado de cada planejamento (tabelas 2, 3 e 4) serviram como dados de entrada para construção do modelo secundário polinomial de superfície de resposta. No estabelecimento deste modelo foram utilizadas somente as variáveis com efeito significativo ($p < 0.05$) sobre o TPT. As análises do efeito de cada variável sobre o TPT (para cada planejamento) foram realizadas mediante utilização do *software* Statistica 7.0 (Statsoft, EUA).

A forma genérica da equação do modelo polinomial de superfície de resposta está definida na equação 1, seguindo o proposto por McKellar e Lu (2004):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \text{ temperatura} + \beta_2 \text{ temperatura}^2 + \beta_3 \text{ pH} + \beta_4 \text{ pH}^2 + \beta_5 \text{ sal} + \beta_6 \text{ sal}^2 + \beta_7 \text{ temperatura} * \text{ pH} + \beta_8 \text{ temperatura} * \text{ sal} + \beta_9 \text{ pH} * \text{ sal} + \beta_{10} \text{ temperatura} * \text{ pH} * \text{ sal} + \varepsilon$$

equação 1.

Onde: $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_{ij}$ representam os coeficientes estimados de regressão, com β_0 sendo a constante; $\beta_1, \beta_3, \beta_5$ representam efeitos lineares; $\beta_2, \beta_4, \beta_6$ representam os efeitos quadráticos; $\beta_7, \beta_8, \beta_9$ e β_{10} representam a interação dos efeitos; ε erro; Y=TPT.

Um modelo simplificado foi gerado por *backward stepwise regression*, com efeitos não significativos ($p > 0.05$) excluídos sem prejudicar a hierarquia do modelo, usando experimentos em duplicatas. A verificação matemática dos modelos foi realizada: coeficiente de ajuste (R^2) e relação $F_{\text{cal}} / F_{\text{tab}}$. A superfície de resposta do modelo que representa o TPT em função das variáveis significativas foi gerada utilizando a ferramenta *Experimental Design, Central Composite, non factorial* do *software* Statistica 7.0 (Statsoft, EUA).

2.5 Verificação biológica

O modelo polinomial de superfície de resposta gerado foi testado, respeitando-se a faixa de variação dos parâmetros utilizados para o seu estabelecimento, em 5 condições aleatórias de temperatura e concentração de NaCl: (16°C e 1,4%, 24°C e 0,9%, 29°C e 1,05%, 31°C e 0,7% e 39°C e 0,85%,). Os valores do TPT obtidos experimentalmente foram comparados aos calculados pelo modelo. Estes dados foram acrescentados aos valores preditos/observados pelo modelo para estimativa dos parâmetros bias e exatidão.

3. Resultados

A modelagem primária de população vs tempo não obteve bom ajuste nos modelos de crescimento. Este fato pode ser devido a falta de um número maior de pontos de coleta. No entanto, o intuito da pesquisa, determinar o Tempo para Produção de Toxinas (TPT), foi atingido.

3.1 Influência das variáveis sobre o TPT

No apêndice 2 estão apresentados os dados do acompanhamento da variação da população ao longo do tempo e do TPT para cada um dos ensaios realizados, envolvendo todos os planejamentos aplicados.

Na tabela 5 estão apresentados os resultados de TPT vs população para avaliação da influência das variáveis selecionadas sobre o TPT no *screening* realizado a altas temperaturas. Pela tabela 5 pode-se observar que os TPT encontrados variaram de 8 a 136h. A menor população enumerada com produção de enterotoxina foi de $1,2 \times 10^4$ UFC/mL, a 46°C.

Tabela 5. **Influência das variáveis selecionadas sobre o TPT no screening realizado a altas temperaturas.**

<i>Ensaio</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Sal (%)</i>	<i>UFC/mL</i>	<i>TPT (h)</i>
1	20	5,5	1	9×10^4	40
2	40	5,5	1	$5,5 \times 10^5$	8
3	20	6,5	1	$1,1 \times 10^6$	40
4	40	6,5	1	8×10^6	8
5	20	5,5	2	$1,9 \times 10^5$	32
6	40	5,5	2	$4,1 \times 10^6$	8
7	20	6,5	2	$9,5 \times 10^5$	32
8	40	6,5	2	$4,7 \times 10^6$	8
9	30	6,0	1,5	$1,95 \times 10^7$	16
10	30	6,0	1,5	$2,2 \times 10^7$	16
11	30	6,0	1,5	$2,4 \times 10^7$	16
12	13	6,0	1,5	$1,2 \times 10^4$	136
13	46	6,0	1,5	$1,2 \times 10^4$	8
14	30	5,3	1,5	3×10^6	16
15	30	6,7	1,5	$6,4 \times 10^6$	16
16	30	6,0	0,8	$1,9 \times 10^7$	16
17	30	6,0	2,2	$4,5 \times 10^6$	16

A figura 1 representa a influência da redução de temperatura sobre o TPT, com valores de pH e concentração de NaCl fixos em 6 e 1,5%, respectivamente.

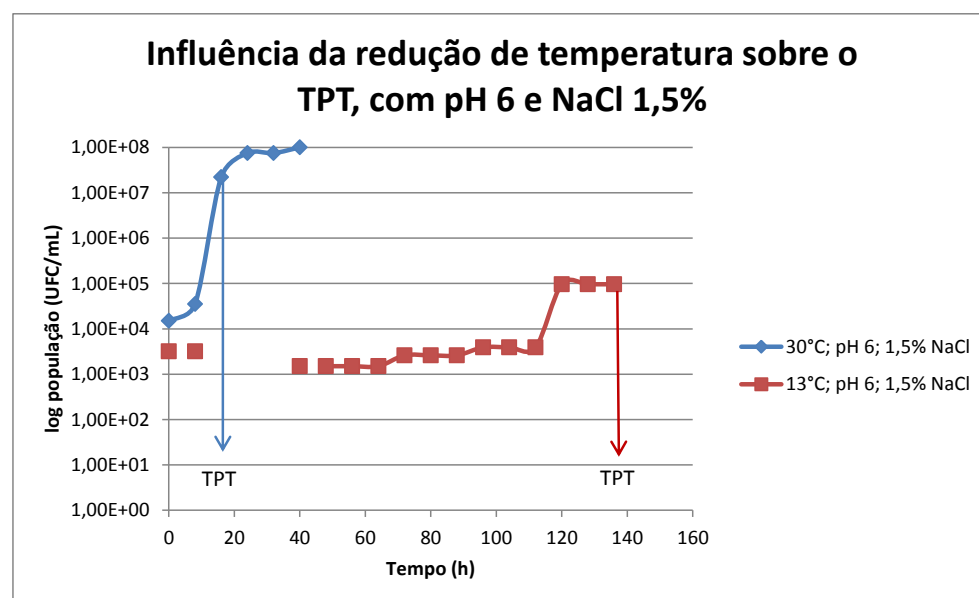


Figura 1. **Influência da redução de temperatura sobre o TPT, com pH 6 e NaCl 1,5%.**

Na figura 1 pode-se observar que uma redução de temperatura de 30 para 13°C, a pH 6 e concentração de NaCl de 1,5%, é capaz de prolongar o TPT em 120h, ou seja, para extensão do TPT, o ideal é a conservação do frango em temperaturas $\leq 13^{\circ}\text{C}$.

Na figura 2 está apresentada a influência da variação de pH sobre o TPT, com temperatura e concentração de NaCl fixas em 40°C e 1%, respectivamente.

A partir da figura 2 pode-se observar que a redução do no valor de pH de 6,5 para 5,5, em condições constantes de temperatura e concentração de NaCl, não tem influência sobre o TPT. Isto pode estar associado à pequena faixa de variação estudada nesta pesquisa (5,3 – 6,7). Entretanto, uma variação maior que essa já faria com que a carne de frango tivesse seus atributos sensoriais alterados.

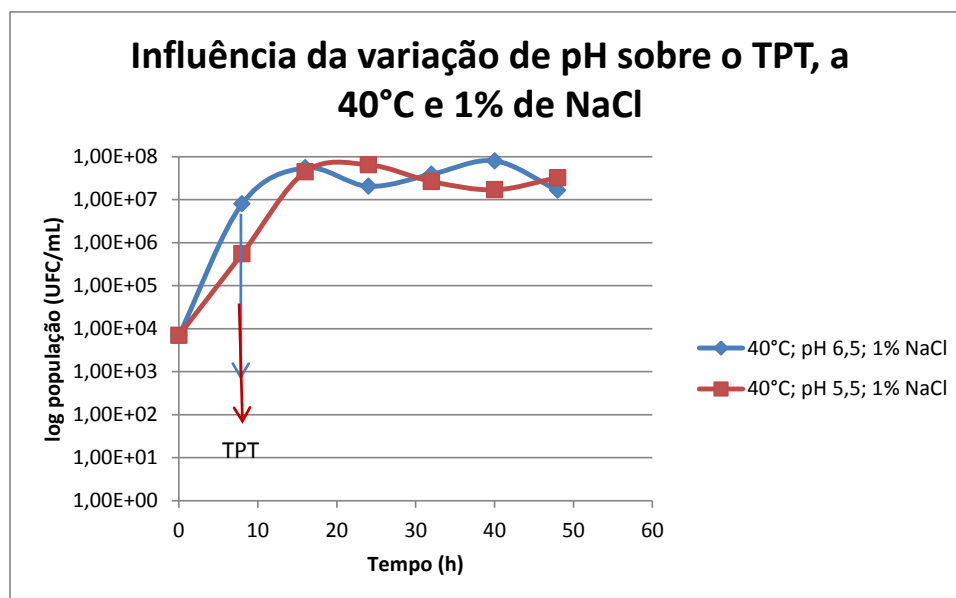


Figura 2. **Influência da variação de pH sobre o TPT a 40°C e 1% de NaCl.**

Na figura 3 está apresentada a influência do aumento da concentração de NaCl (0,8 – 2,3%) sobre o TPT, mantendo-se fixos os valores de temperatura (30°C) e pH (6).

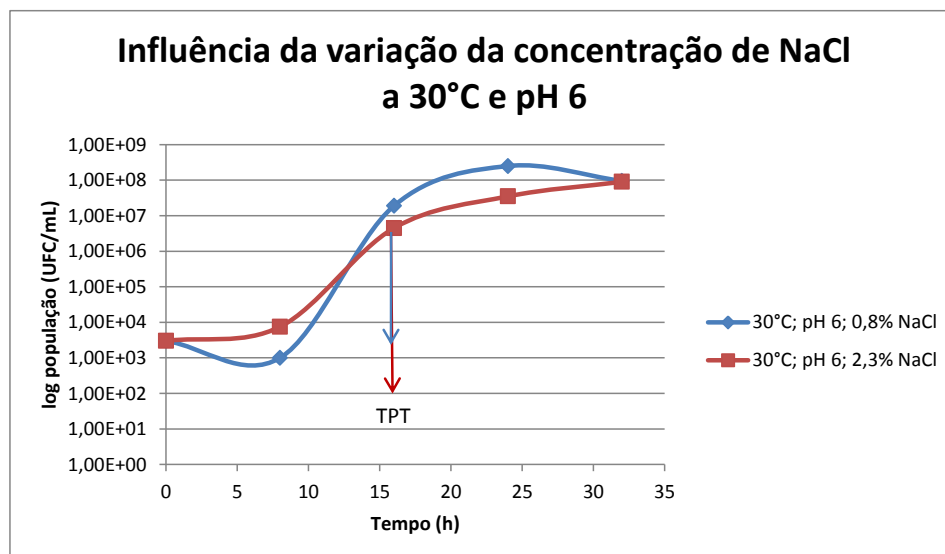


Figura 3. **Influência da variação da concentração de NaCl a 30°C e pH 6.**

A partir da figura 3 pode-se observar que o aumento na concentração de NaCl (0,8 – 2,3%) não exerce efeito sobre o TPT, quando fixadas a temperatura (30°C) e pH (6).

Para avaliação da influência de cada uma das variáveis sobre o TPT, no *screening* de altas temperaturas, foi realizada a análise estatística dos efeitos. Estes resultados estão apresentados na tabela 6. Considerando como significativo apenas os efeitos com $p < 0,05$, pode-se observar que somente a temperatura, linear e quadrática, possuem efeito significativo sobre o TPT. As demais variáveis, bem como suas interações, não obtiveram esse efeito.

Tabela 6. **Efeito das variáveis sobre o TPT para o *screening* de altas temperaturas (valores significativos em vermelho).**

Fator	Efeito	Erro padrão	t(7)	p	-95% intervalo de confiança	+95% intervalo de confiança
Média/interação	17,0972	10,21664	1,67347	0,138151	-7,0613	41,2557
(1) Temperatura (°C)(L)	-47,3943	9,68168	-4,89526	0,001763	-70,2878	-24,5008
Temperatura (°C)(Q)	30,5660	10,47318	2,91850	0,022388	5,8008	55,3311
(2) pH (L)	-0,0611	9,68228	-0,00631	0,995140	-22,9561	22,8338
pH (Q)	-5,1467	10,47261	-0,49144	0,638149	-29,9104	19,6171
(3) % NaCl (L)	-1,5069	10,15752	-0,14836	0,886245	-25,5257	22,5118
% NaCl (Q)	-6,6840	11,99919	-0,55704	0,594855	-35,0576	21,6896
1L x 2L	0,0000	12,67533	0,00000	1,000000	-29,9724	29,9724
1L x 3L	4,0000	12,67533	0,31577	0,761526	-25,9724	33,9724
2L x 3L	0,0000	12,67533	0,00000	1,000000	-29,9724	29,9724

Na tabela 7 estão apresentados os resultados de TPT vs população para avaliação da influência das variáveis selecionadas sobre o TPT no *screening* realizado a baixas temperaturas.

Tabela 7. Influência das variáveis selecionadas sobre o TPT no *screening* realizado a baixas temperaturas.

<i>Ensaio</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Sal (%)</i>	<i>UFC/mL</i>	<i>TPT (h)</i>
1	5	1	4,5x10 ¹ (144h)	-
2	15	1	6,3x10 ⁵	96
3	5	2	8x10 ¹	-
4	15	2	2,6x10 ⁶	96
5	10	1,5	3,9x10 ⁴ (144h)	-
6	10	1,5	8,3x10 ⁴ (144h)	-
7	10	1,5	3,2x10 ⁴ (144h)	-
8	3	1,5	4,5x10 ¹ (144h)	-
9	17	1,5	1,6x10 ⁶	48
10	10	0,8	2,3x10 ⁴ (144h)	-
11	10	2,2	1,3x10 ⁴ (144h)	-

Pela tabela 7 pode-se observar que o menor TPT encontrado foi de 48h (17°C, 1,5% de NaCl). A população neste caso encontrava-se em 1,6x10⁶ UFC/mL. Dois ensaios a 15°C produziram enterotoxina em 96h, sendo que nos demais experimentos não houve detecção de SE em 144h.

A figura 4 representa a influência da redução da temperatura sobre o TPT, variáveis analisadas no TPT.

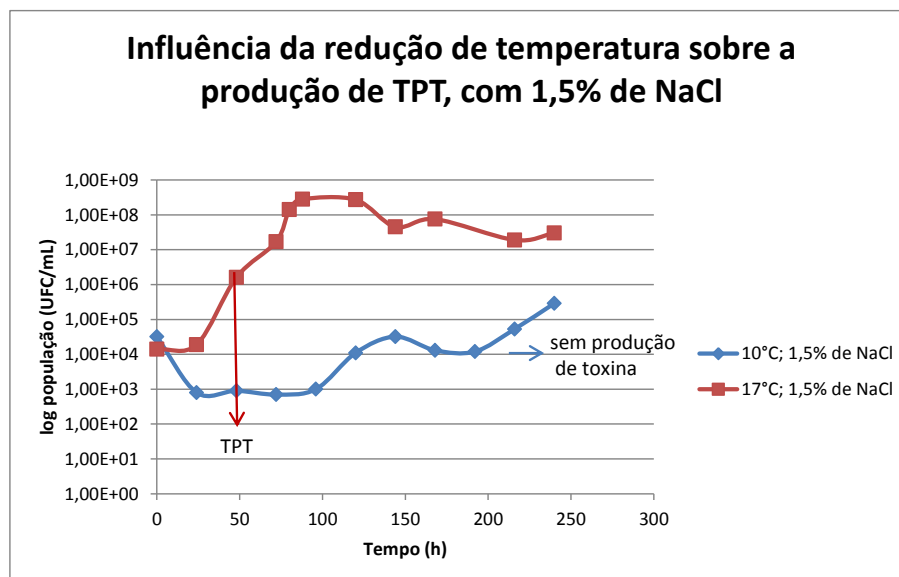


Figura 4. **Influência da redução de temperatura sobre a produção de TPT, com concentração de NaCl fixa em 1,5%.**

A partir da figura 4, pode-se observar que quando há o decréscimo na temperatura de estocagem (17 para 10°C), a produção de enterotoxina não é observada quando a concentração de NaCl é mantida em 1,5%.

A figura 5 apresenta a influência da concentração de NaCl sobre o TPT quando a temperatura é fixada em 15°C.

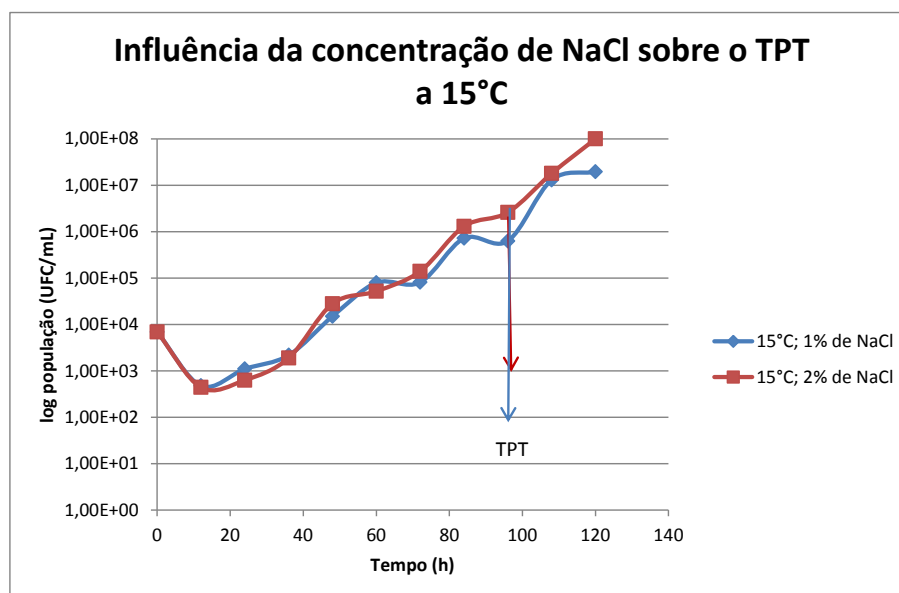


Figura 5. **Influência da concentração de NaCl sobre o TPT com temperatura fixa em 15°C.**

A partir da figura 5, pode-se observar que a variação na concentração de NaCl não exerce influência significativa no TPT, quando a temperatura é mantida constante a 15°C.

A tabela 8 apresenta os efeitos das variáveis para o *screening* de baixas temperaturas.

Tabela 8. Efeito das variáveis sobre o TPT para o *screening* de baixas temperaturas (valores significativos em vermelho).

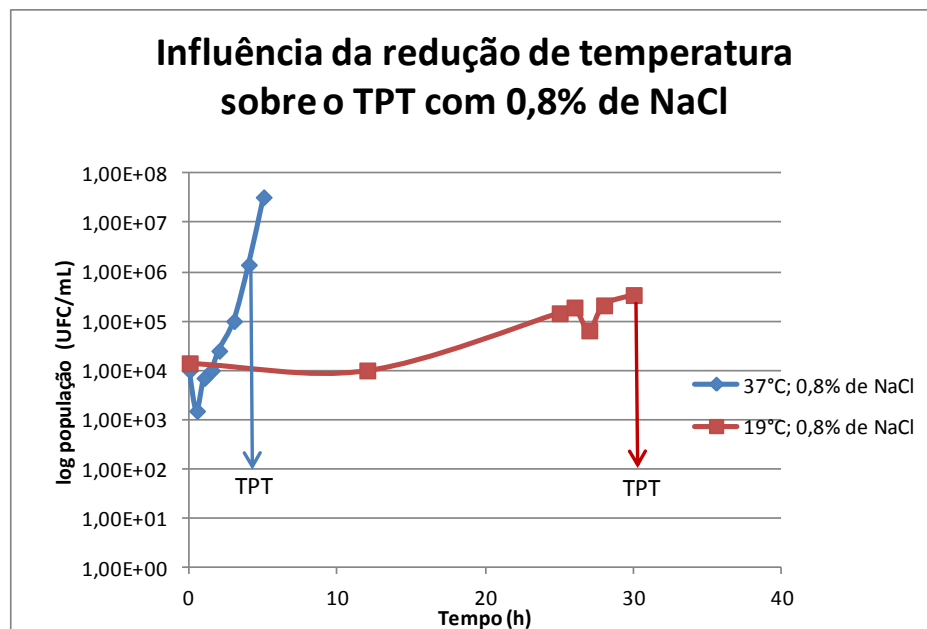
Fator	Efeito	Erro padrão	t(5)	p	-95% intervalo de confiança	+95% intervalo de confiança
Média/interação	143,9935	3,740476	38,4960	0,000000	134,3783	153,6087
(1) Temperatura (°C)(L)	-58,1818	4,604834	-12,6349	0,000055	-70,0189	-46,3447
Temperatura (°C)(Q)	-48,7232	5,527700	-8,8144	0,000312	-62,9326	-34,5137
(2) % NaCl (L)	0,0000	4,604834	0,0000	1,000000	-11,8371	11,8371
% NaCl (Q)	0,2564	5,527700	0,0464	0,964794	-13,9530	14,4658
1L x 2L	0,0000	6,479576	0,0000	1,000000	-16,6563	16,6563

Na tabela 9 estão apresentados os resultados de TPT vs população para avaliação da influência das variáveis selecionadas sobre o TPT no planejamento Composto Central, não fatorial, realizado a baixas e altas temperaturas.

Tabela 9. Influência das variáveis selecionadas sobre o TPT para o planejamento Composto Central, não fatorial realizado a baixas e altas temperaturas.

Ensaio	Temperatura (°C)	Sal (%)	UFC/mL	TPT (h)
1	19	0,8	3,4x10 ⁵	30
2	37	0,8	1,4 x10 ⁶	4
3	19	1,3	2,5 x10 ⁵	30
4	37	1,3	1,1 x10 ⁶	4
5	28	1	9,5 x10 ⁵	10
6	28	1	1,4 x10 ⁶	10
7	28	1	1,15 x10 ⁵	10
8	15	1	6 x10 ⁴	120
9	41	1	9 x10 ⁵	4
10	28	0,6	8 x10 ⁵	10
11	28	1,6	9,5 x10 ⁵	10

A figura 6 representa a influência da redução da temperatura sobre o TPT com a concentração de NaCl fixa em 0,8%.



A partir da figura 6, pode-se observar que a redução da temperatura (37 para 19°C) elevou o TPT em 26h (4 para 30h).

A figura 7 apresenta a influência da variação da concentração de NaCl sobre o TPT, com a temperatura constante em 37°C.

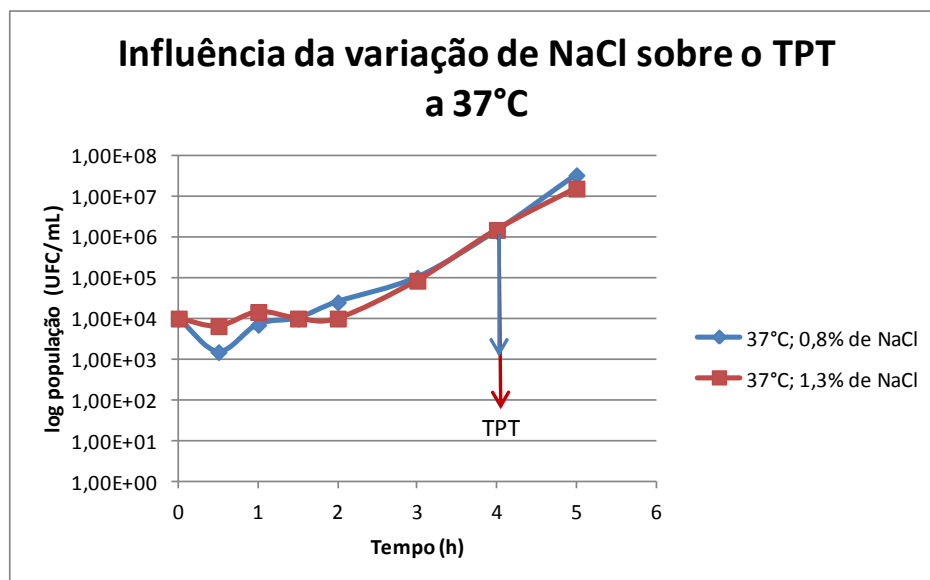


Figura 7. **Influência da variação de NaCl sobre o TPT com temperatura fixa em 37°C.**

A partir da figura 7, pode-se observar que a variação da concentração de NaCl (0,8 para 1,3%) não exerce influência significativa sobre o TPT, com temperatura fixa em 37°C.

A tabela 10 apresenta os efeitos das variáveis sobre o TPT para o planejamento Composto Central, não fatorial de baixas e altas temperaturas.

Tabela 10. Efeito das variáveis sobre o TPT para o planejamento Composto Central, não fatorial de baixas e altas temperaturas (valores significativos em vermelho).

Fator	Efeito	Erro padrão	t(5)	p	-95% intervalo de confiança	+95% intervalo de confiança
Média/interação	7,4718	8,60952	0,86785	0,425161	-14,6597	29,6032
(1) Temperatura (°C)(L)	-45,3369	10,97881	-4,12950	0,009089	-73,5589	-17,1150
Temperatura (°C)(Q)	35,0900	13,53968	2,59164	0,048740	0,2852	69,8949
(2) % NaCl (L)	-1,2128	8,99715	-0,13480	0,898029	-24,3407	21,9151
% NaCl (Q)	-0,7195	6,90254	-0,10424	0,921032	-18,4630	17,0240
1L x 2L	3,8674	15,18441	0,25469	0,809103	-35,1654	42,9002

Com o auxílio do *software* Statistica 7 (Statsoft, EUA), foi calculada a tabela de coeficientes de regressão para construção do modelo polinomial.

Tabela 11. Coeficientes de regressão utilizados para construção do modelo polinomial.

Fator	Coef. Regress.	Erro padrão	t(8)	p	-95% intervalo de confiança	+95% intervalo de confiança
Média/interação	250,3884	46,69685	5,36200	0,000676	142,7053	358,0715
(1) Temperatura (°C)(L)	-14,8474	3,46959	-4,27931	0,002690	-22,8483	-6,8466
Temperatura (°C)(Q)	0,2198	0,06131	3,58482	0,007138	0,0784	0,3611

Com base na Tabela 11, o modelo polinomial que representará o tempo para produção de toxina em condições de abuso de refrigeração e resfriamento lento foi definido como:

$$TPT(h) = 250,3884 - 14,8474T + 0,2198T^2 \quad (R^2=0,8347). \text{ Equação 2.}$$

Onde T=temperatura (°C)

A análise de variância (ANOVA) para este modelo está apresentada na tabela 12.

Tabela 12. Análise de variância para o modelo de tempo para produção de toxina

Fonte de variação	SS	gl	SQM	Fcal	Ftab	R ²
regressão	6046,879	2	3023,4395	20,21088	4,46	0,834785
resíduo	1196,757	8	149,594625			
total	7243,636	10	724,3636			

Quando os parâmetros da análise de variância são analisados, pode-se observar que a relação F_{cal}/F_{tab} é de 4,53 e o valor de $R^2=0,8347$. Com base nestes dois parâmetros o modelo é considerado aceitável. Nas tabelas 13 e 14 estão apresentados os valores obtidos a partir do modelo e da verificação biológica, para obtenção dos fatores de bias e precisão.

Tabela 13. **Dados gerados a partir da verificação matemática do modelo gerado.**

TPT, valores observados (h)	TPT, valores preditos (h)
30	47,62485
4	1,901626
30	47,62485
4	1,901626
10	6,961655
10	6,961655
10	6,961655
96	74,02067
4	10,11811
10	6,961655
10	6,961655
Bias = 0,856, exatidão = 1,635	

Tabela 14. **Verificação biológica**

TPT, valores observados (h)	TPT, valores preditos (h)
48	69,0988
20	20,6556
10	4,6656
10	1,3468
4	8,1724
Bias = 0,718, exatidão = 2,172	

Devido ao pequeno número de experimentos, a verificação biológica apresenta poucos termos para normalização da distribuição dos erros. Assim, optou-se por utilizar, como parâmetros de verificação matemática (bias e exatidão), aqueles obtidos pela junção dos TPTs observados e preditos obtidos pela análise do gráfico de preditos $\times$ observados e TPTs obtidos pela validação biológica. Na Tabela 15 estão apresentados esses valores.

Tabela 15. Dados utilizados para obtenção dos fatores bias e exatidão.

TPT, valores observados (h)	TPT, valores preditos (h)
30	47,62485
4	1,901626
30	47,62485
4	1,901626
10	6,961655
10	6,961655
10	6,961655
96	74,02067
4	10,11811
10	6,961655
10	6,961655
48	69,0988
20	20,6556
10	4,6656
10	1,3468

Bias = 0,81, exatidão = 1,787

Quando foram avaliados os parâmetros bias e exatidão, obteve-se: 0,81 e 1,787, respectivamente. O gráfico dos preditos x observados que representa o modelo está apresentado da Figura 8. Por essa figura pode-se observar uma distribuição aleatória dos pontos ao longo da linha de igualdade, indicando que o modelo não é tendencioso.

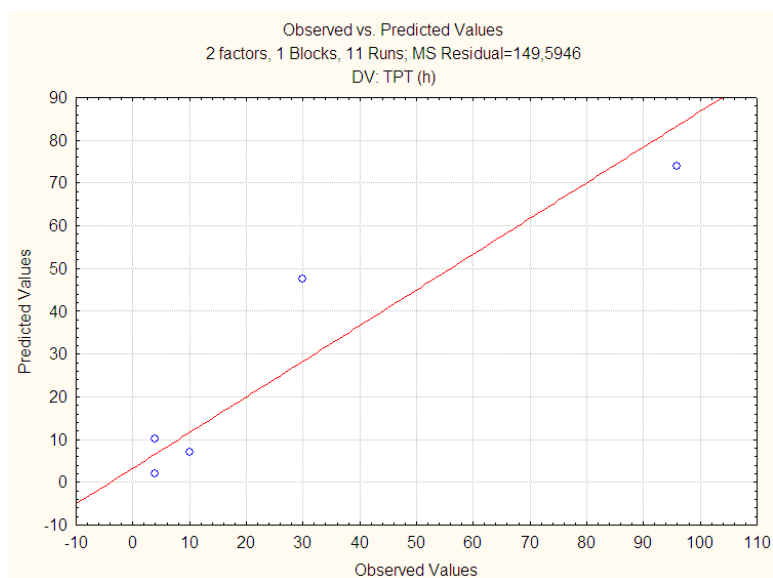


Figura 8. Valores preditos x observados para TPT (h), com base no modelo polinomial obtido.

A partir dos dados obtidos, foi gerado um modelo de superfície de resposta, que descreve o TPT (variável dependente) em função da temperatura (variável significativa e concentração de sal (variável não significativa; Figura 9).

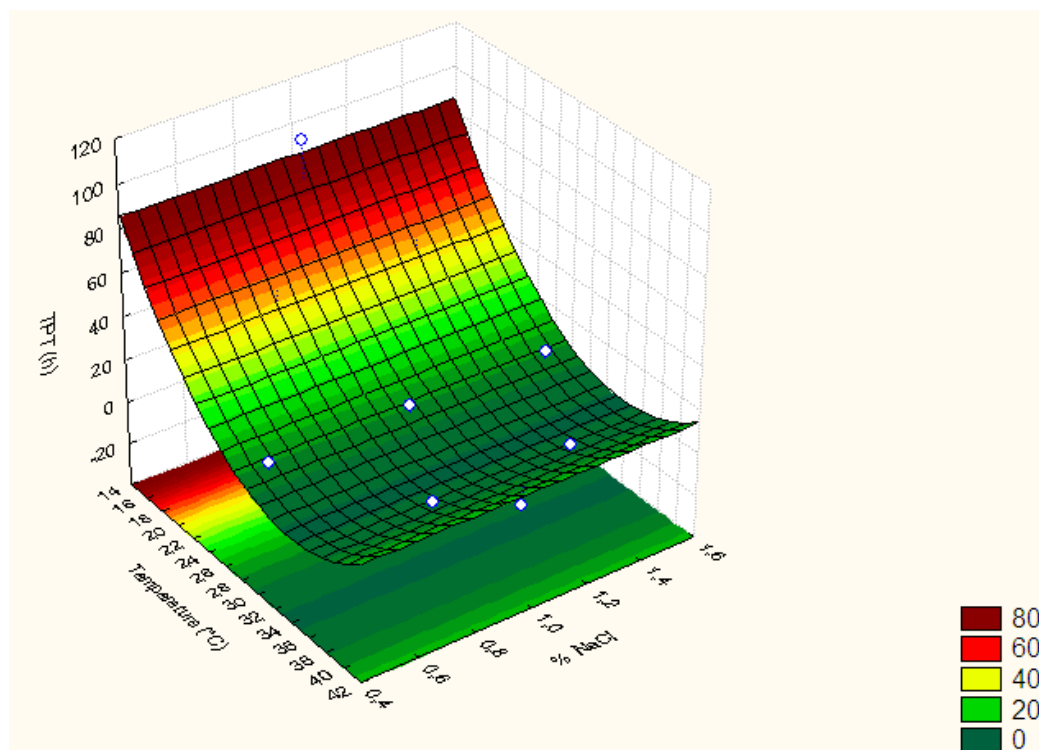


Figura 9. Superfície de resposta para TPT (h) em função da temperatura e concentração de NaCl.

4. Discussão

Os planejamentos experimentais propostos para *sreening* atenderam sua função selecionando as variáveis de efeito significativo sobre o TPT. Pelos resultados obtidos pode-se observar que em temperaturas altas, que simularam a temperatura no interior das cozinhas institucionais, populações de 10^4 UFC/g já foram capazes de produzir a toxina, independentemente da concentração de NaCl. Estes resultados concordam com os obtidos por Meyrand e colaboradores (1998), que obtiveram produção de toxina com esse nível populacional em meio de cultura líquido. Entretanto, outros pesquisadores citam que a produção de toxina só ocorrem em níveis populacionais maiores que 10^6 UFC/g ou mL (Balaban e Rasooly, 2000; Bathia *et al*, 2007; Hennekinne *et al*, 2012). Os resultados destes pesquisadores estão em desacordo com o

que foi evidenciado nesta pesquisa, pois mesmo em níveis populacionais menores a produção de SE foi evidenciada. Em adição, pode-se observar que em temperaturas mais elevadas (46°C), a população mínima necessária à produção de toxina pode ser ainda menor, comprovando que a temperatura é a variável com maior efeito sobre o TPT.

Quando se analisa os efeitos das variáveis, de forma independente, pode-se observar que dentro da faixa de variação do pH da carne de frango (5,9 – 6,2), essa variável não foi significativa. Cabe ressaltar que outras faixas de pH (<5,0 ou >7,0) não foram analisadas pois alterariam as características sensoriais do produto. A concentração de sal utilizada, que simulou o utilizado em produtos industrializados prontos para o consumo, não apresentou efeito significativo sobre o TPT. A variável que apresentou o maior efeito no aumento de TPT foi a temperatura. Pelas análises dos modelos primários pode-se observar que reduções de temperatura de 30 para 19°C, que ainda seria considerado abuso de temperatura de refrigeração, já são capazes de prolongar em até 26h o TPT. Por outro lado, a conservação do frango a temperaturas $\leq 10^{\circ}\text{C}$, com 0,8 a 2,2% de NaCl, garantiu a não produção de toxina por até 144h.

No estabelecimento do modelo secundário polinomial de superfície de resposta, foram significativas a temperatura linear e quadrática. Os modelos polinomiais são os mais comumente aplicados em microbiologia preditiva. Eles são atrativos, primeiramente, pois os dados experimentais podem ser trabalhados de modo relativamente fácil, aplicando-se uma regressão linear múltipla. Em segundo lugar, os modelos polinomiais permitem a utilização de praticamente qualquer fator ambiental, além de suas interações. Assim, a aplicação de modelos polinomiais é um caminho simples de resumir as informações fornecidas por um conjunto de dados (Ross e Daalgaard, 2004).

Entretanto, apesar das vantagens citadas para utilização dos modelos polinomiais, algumas de suas propriedades limitam seu uso como modelo secundário. Uma das propriedades limitantes é que modelos polinomiais podem incluir muitos coeficientes sem interpretação biológica. Por exemplo, quando se estuda o efeito de 4 parâmetros ambientais sobre uma determinada variável resposta, o modelo polinomial gerado teria até 15 coeficientes, o que dificultaria seu entendimento (Ross e Daalgaard,

2004). Contudo, nesta pesquisa o modelo polinomial foi aplicado pois somente temperatura teve efeito significativo sobre o TPT, tornando o modelo mais simples e parcimonioso. Pesquisas anteriores como a realizada por Silva e colaboradores (2010) atestaram a qualidade do modelo polinomial em detrimento ao modelo de Arrhenius-Davey na descrição dos efeitos de temperatura e pH sobre o tempo de adaptação de *Aspergillus section Nigri* IOC 4573 em néctar de manga.

O coeficiente de determinação obtido para o modelo, 0,83, é aceitável. Para obtenção dos valores bias e exatidão, foram considerados os valores observados e preditos de TPT gerados a partir do modelo e da verificação biológica. Outros parâmetros de validação matemática, como bias (0,81) e relação $F_{\text{tab}}/F_{\text{calc}}$ (4,53) também são considerados aceitáveis quando se modela os efeitos de variáveis independentes sobre o comportamento de micro-organismos patogênicos. Nesse sentido, Ross (1999) propõe uma interpretação para o fator bias usado na análise de performance dos modelos que envolvam patógenos: 0,9-1,05, modelo considerado bom; 0,7-0,9 ou 1,06-1,15 modelo considerado aceitável; <0,7 ou >1,15, modelo deve ser considerado inaceitável. De acordo com este critério o valor de bias obtido nesta pesquisa para o modelo secundário é considerado aceitável.

Analisando a superfície de resposta, pode-se observar que a temperatura de abuso de 10°C, concentrações de 0,3 e 0,4% já seriam suficientes para manter o produto livre de SEs por 24h. Com base na revisão de literatura realizada para construção deste artigo, observou-se uma deficiência na existência de trabalhos que modelem a produção de toxina estafilocócica em matrizes alimentares específicas, conforme também constatado por Schelin e colaboradores (2011).

Este artigo apresenta um modelo preditivo que pode ser utilizado com facilidade por microbiologistas para avaliação do efeito que pequenas alterações de temperatura podem causar sobre o TPT, podendo ser utilizado ainda para calcular o incremento ou redução neste tempo, e ser usado na modelagem do risco associado.

5. Agradecimentos

CNPq pelo suporte financeiro, Norma Miya e Laura de Fátima pela ajuda laboratorial.

6. Referências

- BALABAN, N.; RASOOLY, A. (2000). Review: Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, 61, p.1-10.
- BATHIA, A.; ZAHOOR, S. (2007). *Staphylococcus aureus* enterotoxins: A review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.3, p.188-197.
- BERGDOLL, M.S. (1989). *Staphylococcus aureus*. In: **M.P. Doyle (Ed.) Foodborne Bacterial Pathogens**, Marcel Dekker Inc., New York, p. 463-523.
- CASTILLEJO-RODRIGUEZ, et al. (2002). Assessment of mathematical models for predicting *Staphylococcus aureus* growth in cooked meats products. **Journal of Food Protection**, 64(4), p.659-665.
- DALGAARD, P. 2000. Fresh and lightly preserved food. In: **Man, CMD, Jones, A.A. (Eds.), Shelf life evaluation of foods, second ed. Aspen Publishing Inc., MD, USA**, p.110-139.
- DING, T. et al. (2011) Development of response surface model to describe the effect of temperature and relative humidity on *Staphylococcus aureus* on cabbage. In: **7th International Conference 2011 - Predictive Modelling of Food Quality and Safety, 2011**, Dublin.: UCD, v. 1. p.372-375.
- HENNEKINNE, J.A.; DE BUYSER, M.L.; DRAGACCI, S. 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, 36, p.815-836.
- GOTZ, F.; BANNERMAN, T.; SCHLEIFER, K.H. (2006). The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus* **Prokaryotes**, v.4, p.5–75.
- McKELLAR, R.C.; LU, X. (2004) **Modelling microbial responses in food**. Ed.: Boca Raton, CRC Press.

MEYRAND, A et al. (1998) Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goat's milk. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.537-544.

MIN, K.J.; et al. (2013). Effect of the temperature on the production of staphylococcal enterotoxin and thermal inactivation kinetics of *Staphylococcus aureus* in selected ready to eat (RTE) in Korea. **Journal of Food Safety**, v.33, p.17-24.

NOTERMANS, S.; HEUVELMAN, J. 1983. Combined effect of water activity, pH and sub-optimal temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, 48, p.1832-1840.

OLIVEIRA, A.M. et al. (2010) Behavior and Enterotoxin Production by Coagulase Negative *Staphylococcus* in Cooked Ham, Reconstituted Skimmed Milk, and Confectionery Cream. **Journal of Food Science**, v.75 (7). p.M475-M481.

ROSENGREN, A.; FABRICIUS, A.; GUSS, B.; SYLVEN, S.; LINDQVIST, R. 2010. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced farm dairies. **International Journal of Food Microbiology**, 144, p.263-269.

ROSS, T.; DALGAARD, P. (2004). Secondary models. *In: Modelling microbial responses in food*, chapter 3.

ROSS, T.; DALGAARD, P.; TIENUNGOON, S. 2000. Predictive modeling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. **International Journal of Food Microbiology**, 62, p.231-245.

ROSS, T. 1999. Predictive food microbiology models in the meat industry. (MSRC.003). **Meat and Livestock**, Australia.

ROSS, T. (1996) Indices for performance evaluation of predictive models food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, V.81 p. 501-508.

SCHELIN, J.; et al. (2011). The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**, 2:6, p. 580 – 592.

SILVA, A.R.; SANT'ANA, A.S.; MASSAGUER, P.R. (2010). Modelling the lag time and growth rate of *Aspergillus* section *Nigri* IOC 4573 in mango nectar as a function of temperature and pH. **Journal of Applied Microbiology**, 109, p.1105-1116.

TROLLER, J.A. 1971. Effect of water activity on enterotoxin B production and growth of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**, 21, p.435–439.

TROLLER, J.A.; FRAZIER, W.C. 1963. Repression of *Staphylococcus aureus* by food bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 11(2), p.163-165.

CAPÍTULO 4

Expressão de genes codificadores para Enterotoxinas Estafilocócicas (SE) em cepas recuperadas de instalações de cozinhas institucionais da cidade de Campinas, SP, Brasil

Chaves, R.D.^{1*}; Pradella, F.²; Farias, A.S.²; Pereira, J.L.¹.

¹Laboratório de Toxinas Microbianas. Dep. de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Campinas, SP - Brasil

²Laboratório de Neuroimunomodulação. Dep. de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Campinas, SP - Brasil.

Título curto: Expressão de genes baseado no gene 16S

Artigo a ser submetido à revista *Food Microbiology*

***Autor correspondente:** Rafael Djalma Chaves

chaves@fea.unicamp.br

phone: 55 (19) 3521 – 4012

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar os genes responsáveis pela produção de enterotoxinas estafilocócicas (SE) em cepas recuperadas de instalações de cozinhas institucionais da cidade de Campinas, SP, Brasil, com auxílio da técnica de PCR Quantitativo. Seis isolados previamente identificados em nível de espécie (*S. aureus* n=3, *S. xylosus* n=2 e *S. epidermidis* n=1) foram utilizados para verificação, identificação e estimativa da expressão dos genes codificadores das SE (SEA a SEE). Todos os isolados analisados possuíam genes ativos capazes de expressar todas SE avaliadas. A maioria dos isolados expressou mais SED. Estes dados mostram um perfil sorológico diferente da maioria dos casos relatados de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs), onde cerca de 80% dos surtos relacionados à intoxicação por SE estão associados à SEA. Metade dos isolados produtores de enterotoxinas presentes neste trabalho eram linhagens coagulase-negativa (CNS), reafirmando a importância destas cepas em surtos provocados por SEs.

Highlights:

- Identificação de Enterotoxinas Estafilocócicas (SEs)
- Quantificação de SEs por RT-qPCR
- *Staphylococcus* coagulase-negativa produtores de SE

Palavras-chave: Enterotoxina Estafilocócica, PCR, expressão gênica

1. Introdução

Staphylococcus aureus enterotoxigênicos estão entre os principais patógenos causadores de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs) no mundo. No Brasil, entre os casos de surtos com agente etiológico confirmado, linhagens coagulase-positiva (CP) de *Staphylococcus* respondem por aproximadamente 20% dos surtos relatados (Brasil, 2013).

Enterotoxinas estafilocócicas (SEs) fazem parte de um grupo específico de exotoxinas, juntamente com toxinas exfoliativas (ETs) e TSST-1, toxina responsável pela Síndrome do Choque Tóxico (Hennekinne, *et al*, 2012). Possuem atividade de superantígeno, provocando proliferação de células T de maneira inespecífica (Hennekinne *et al*, 2012). Apenas as SE são relacionadas a surtos de intoxicação alimentar.

As SE envolvidas em surtos são classificadas sorologicamente em 5 grupos principais clássicos, referidas como SEA a SEE, sendo a SEC subdividida em 3 variantes (Becker *et al*, 1998). A maioria dos casos de intoxicação alimentar provocados por SE está relacionada à atividade de SEA (Schmid *et al*, 2009; Veras *et al*, 2008; Kérouaton *et al*, 2007; Cha *et al*, 2006, Asao *et al*, 2003), embora outras SEs também tenham sido detectadas.

Entre os métodos analíticos para detecção de SE podemos destacar ensaios imunológicos, como o ELISA (Ensaio imuno absorvente ligado a enzimas) e o ELFA (Ensaio Fluorescente ligado a enzimas) e espectrometria de massa.

Os métodos de PCR geralmente detectam genes codificadores de enterotoxinas em linhagens isoladas de alimentos contaminados. Contudo, esta metodologia tem como limitação mostrar apenas a presença / ausência dos genes, sem prover a informação da expressão desses genes no alimento (Hennekinne *et al*, 2012). Nos últimos anos, diversas metodologias baseadas em PCR multiplex almejando genes codificadores de SE tem sido descritos como complemento à detecção direta por métodos imunoenzimáticos, como o ELISA. Para um melhor entendimento da expressão dos genes codificadores de SE, a técnica de PCR Real time quantitativo (qPCR) tem sido mais empregada (Stessl e Wagner, 2013). Usando um gene de expressão estável (*housekeeping*) para normalização, a técnica de qPCR permite a quantificação relativa

da expressão do mRNA (Elaume *et al*, 2004). Duquenne e colaboradores (2010) desenvolveram um eficiente método para quantificar níveis relativos de transcritos para avaliar a expressão de genes codificadores de SE durante o processamento de queijos.

Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram avaliar a expressão relativa dos principais genes codificadores de SE em alimentos (*sea*, *seb*, *sec* (3 variantes), *sed* e *sed*) de isolados recuperados de instalações de cozinhas institucionais e comparar com os resultados obtidos na quantificação global pelo sistema miniVIDAS (bioMérieux).

2. Material e métodos

2.1. Isolados

Seis isolados (previamente identificados em nível de espécie e produtores de SE em meio de cultura) recuperados de instalações de cozinhas institucionais (creches do município de Campinas, SP, Brasil) foram cultivados em tubos inclinados contendo Baird-Parker Agar (BP, Difco, EUA) por 18h/37°C.

2.2 PCR quantitativo

O RNA mensageiro (mRNA) foi extraído usando kit RNAeasy (Qiagen) e o reverso transcrito para cDNA. Para análise foi utilizado Taqman ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Os *primers* para 16S, SEA, SEB, SEC_{1,2,3}, SED e SEE foram desenhados de acordo com proposto por Jonhson e colaboradores (1991) e modificado por Becker e colaboradores (1998; Tabela 1). A análise de PCR foi realizada em 25µl de volume total (20µl de SYBR Green master mix), (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) utilizando 10 ng de cDNA (1µl) e 2µl de cada *primer* (*backward and forward*) com os seguintes ciclos de amplificação: estabilização por 20 segundos a 50°C, desnaturação por 10 minutos a 95°C, 45 ciclos 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Todos os protocolos de PCR foram realizados para genes individuais das toxinas usando-se apenas um par de *primers* para cada tubo. A expressão de cada mRNA específico foi normalizada ao *housekeeping gene* (16S). Os dados foram obtidos por medidas independentes de duplicatas. O valor limiar do

ciclo das medidas individuais não excedeu 0,5 ciclos de amplificação (cada PCR quantitativo é resultado de, pelo menos, 3 experimentos independentes).

Tabela 1. **Primers** utilizados para identificação dos genes responsáveis pela expressão das enterotoxinas SEA-SEE. Jonhson *et al*, 1991; Becker *et al*, 1998.

Nome	Sequência (5' a 3')	Localização
<i>16S-1</i>	CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA	322
<i>16S-2</i>	GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC	777
<i>SEA</i>	CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG	487-507
	TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C	592-613
<i>SEB</i>	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	634-653
	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC	1088-1110
<i>SEC*</i>	CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA	665-690
	TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	913-935
<i>SED</i>	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAA ACG	354-380
	TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC	644-672
<i>SEE</i>	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	482-510
	TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	640-659

*a sequência utilizada cobre as 3 variantes de SEC (1,2,3)

3. Resultados

A tabela 2 apresenta os valores de RFV (Valor Relativo de Fluorescência) obtidos da análise de presença/ausência de SE pelo sistema automatizado miniVIDAS

(bioMérieux), além da estimativa da quantidade de enterotoxinas presente por mL (dados são relativos aos ensaios de detecção de SE realizado no capítulo 2).

Tabela 2. Valores de RFV (obtidos pelo miniVIDAS) e estimativa da quantidade de SE.

Micro-organismo	Local de isolamento	Valor RFV	Estimativa de SE (ng/mL)
<i>S. aureus</i>	Mãos	13 314	6
<i>S. xylosus</i>	Mãos	13 045	5,8
<i>S. epidermidis</i>	Narinas	12 673	5,6
<i>S. aureus</i>	Narinas	13 141	5,8
<i>S. xylosus</i>	Pano de prato	13 509	6
<i>S. aureus</i>	Tábua de corte	12 876	5,7

As concentrações de SE foram estimadas de acordo com proposto por Asao e colaboradores (2003), onde valores de RFV=450 indicavam aproximadamente 0,2ng de SEA por mL. A detecção foi realizada a partir de meio de cultura (caldo BHI, Difco, EUA) em culturas na fase estacionária de crescimento (18h/37°C).

Após a etapa de detecção, as amostras seguiram para análise bio-molecular (Real Time PCR Quantitativo) para estimativa da expressão dos genes codificadores de SE (SEA a SEE).

A figura 1 apresenta a relação entre o número de cópias expressas das SE específicas e o gene utilizado como padrão (normalizador) 16S *housekeeping*. Os gráficos 1A e 1B representam isolados recuperados a partir das mãos de manipuladores de alimentos de creches municipais. Os gráficos 1C e 1D representam isolados recuperados a partir das narinas dos manipuladores. Os gráficos 1E e 1F representam isolados recuperados de elementos utilizados em ambientes de cozinhas, sendo um pano de prato e uma tábua para corte de alimentos, respectivamente.

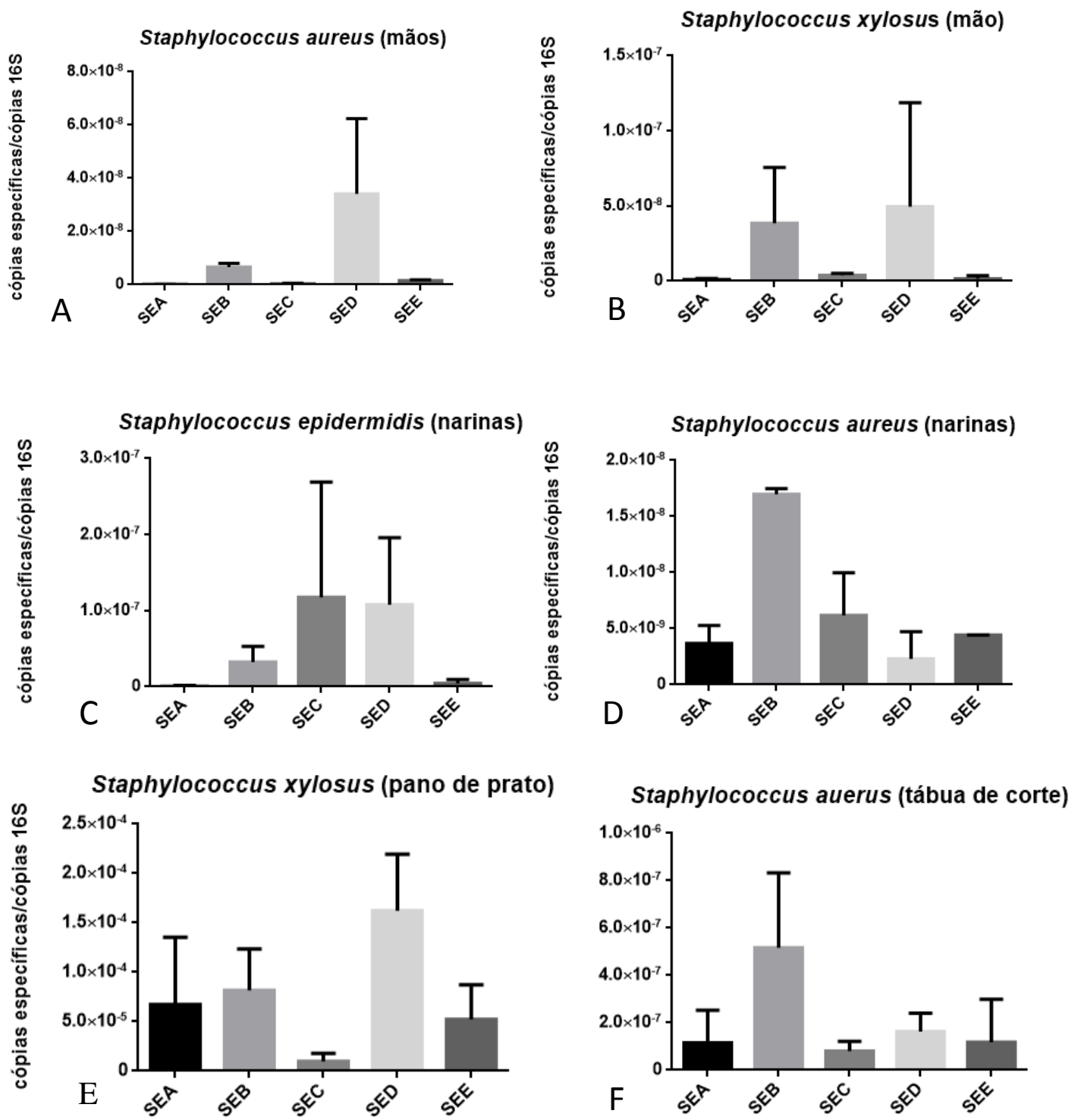


Figura 1. Relação cópias específicas / cópias do gene 16S

As tabelas 3 a 8 apresentam a relação entre o número de cópias específicas amplificadas de cada isolado pelo número de cópias do gene 16S *housekeeping*, além da evidenciar qual gene codificador de SE está sendo mais expresso.

Tabela 3. Número de cópias específicas dos genes codificadores para SE / cópias do gene 16S *housekeeping* (*S. aureus* isolado das mãos).

gene	ce/16S*			
	1**	2	Média ^Σ	expressão ^x
sea	3,86x10 ⁻¹¹	1,02x10 ⁻¹⁰	7,06x10 ⁻¹¹	1
seb	5,67x10 ⁻⁹	7,64 x10 ⁻⁹	6,65x10 ⁻⁹	95
sec***	4,08x10 ⁻¹⁰	5,03x10 ⁻¹⁰	4,56x10 ⁻¹⁰	7
sed	5,41x10 ⁻⁸	1,40x10 ⁻⁸	3,41x10 ⁻⁸	487
see	1,25x10 ⁻⁹	1,72x10 ⁻⁹	1,48x10 ⁻⁹	21

Tabela 4. Número de cópias específicas dos genes codificadores para SE / cópias do gene 16S *housekeeping* (*S. xylosus* isolado das mãos).

gene	ce/16S*			
	1**	2	Média ^Σ	expressão ^x
sea	1,51x10 ⁻⁹	3,09x10 ⁻¹⁰	9,10x10 ⁻¹⁰	1
seb	6,47x10 ⁻⁸	1,24 x10 ⁻⁸	3,85x10 ⁻⁸	43
sec***	2,92x10 ⁻⁹	4,79x10 ⁻⁹	3,85x10 ⁻⁹	4
sed	7,82x10 ⁻¹⁰	9,84x10 ⁻⁸	4,96x10 ⁻⁸	55
see	1,01x10 ⁻¹⁰	3,10x10 ⁻⁹	1,60x10 ⁻⁹	2

Tabela 5. Número de cópias específicas dos genes codificadores para SE / cópias do gene 16S *housekeeping* (*S. epidermidis* isolado das narinas).

gene	ce/16S*			
	1**	2	Média ^Σ	expressão ^x
sea	3,35x10 ⁻¹¹	1,32x10 ⁻⁹	6,79x10 ⁻¹⁰	1
seb	1,78x10 ⁻⁸	4,68 x10 ⁻⁸	3,23x10 ⁻⁸	48
sec***	1,01x10 ⁻⁸	2,24x10 ⁻⁷	1,17x10 ⁻⁷	175
sed	4,52x10 ⁻⁸	1,70x10 ⁻⁷	1,07x10 ⁻⁷	161
see	9,81x10 ⁻¹⁰	7,95x10 ⁻⁹	4,46x10 ⁻⁹	7

Tabela 6. Número de cópias específicas dos genes codificadores para SE / cópias do gene 16S *housekeeping* (*S. aureus* isolado das narinas).

gene	ce/16S*			
	1**	2	Média ^Σ	expressão ^x
sea	4,81x10 ⁻⁹	2,56x10 ⁻⁹	3,69x10 ⁻⁹	2
seb	1,73x10 ⁻⁸	1,66 x10 ⁻⁸	1,69x10 ⁻⁸	7
sec***	3,51x10 ⁻⁹	8,87x10 ⁻⁹	6,19x10 ⁻⁹	3
sed	6,00x10 ⁻¹⁰	4,01x10 ⁻⁹	2,30x10 ⁻⁹	1
see	4,42x10 ⁻⁹	4,44x10 ⁻⁹	4,43x10 ⁻⁹	2

Tabela 7. Número de cópias específicas dos genes codificadores para SE / cópias do gene 16S housekeeping (*S. xylosum* isolado de pano de prato).

gene	ce/16S*			
	1**	2	Média ^Σ	expressão ^x
sea	9,08x10 ⁻⁵	2,53x10 ⁻⁵	5,80x10 ⁻⁵	7
seb	8,32x10 ⁻⁵	8,44x10 ⁻⁵	8,38x10 ⁻⁵	8
sec***	3,94x10 ⁻⁶	9,81x10 ⁻⁶	6,88x10 ⁻⁶	1
sed	2,00x10 ⁻⁴	1,71x10 ⁻⁴	1,85x10 ⁻⁴	17
see	2,36x10 ⁻⁵	2,04x10 ⁻⁵	2,20x10 ⁻⁵	5

Tabela 8. Número de cópias específicas dos genes codificadores para SE / cópias do gene 16S housekeeping (*S. aureus* isolado de tábua de corte).

gene	ce/16S*			
	1**	2	Média ^Σ	expressão ^x
sea	2,83x10 ⁻⁷	1,71x10 ⁻⁷	2,21x10 ⁻⁷	3
seb	4,17x10 ⁻⁷	9,72x10 ⁻⁷	6,95x10 ⁻⁷	9
sec***	8,63x10 ⁻⁸	7,85x10 ⁻⁸	8,24x10 ⁻⁸	1
sed	1,98x10 ⁻⁷	1,61x10 ⁻⁷	1,79x10 ⁻⁷	2
see	6,04x10 ⁻⁸	3,88x10 ⁻⁷	2,24x10 ⁻⁷	3

*cópias específicas/cópias específicas; 16S **expressão gênica, duplicatas; ***primers utilizados abrangendo 3 subtipos de SEC ^Σmédia das duplicatas; ^xvalor de vezes de quanto uma SE é mais expressa que outra.

4. Discussão

Foram analisados 6 isolados provenientes de instalações de cozinhas institucionais da cidade de Campinas, SP, Brasil, todos previamente avaliados positivamente em relação a capacidade de produção de SEs (capítulo 2).

A detecção de enterotoxinas foi realizada no aparelho miniVIDAS (bioMérieux, França). O sistema é baseado em análise ELFA, onde o resultado é positivo / negativo para 7 SEs (SEA, SEB, SEC_{1,2,3}, SED e SEE). O Valor Relativo de Fluorescência (RFV) obtido é calculado e convertido pelo computador em um valor de teste (VT), que corresponde ao valor do sobrenadante dividido pelo valor de fluorescência padrão. Resultados de VT ≥ 0.13 e RFV > 450 indicam positividade da amostra, com sensibilidade de detecção de 0.05ng/mL de enterotoxina.

Asao e colaboradores (2003) estimaram a quantidade de SEA em leite semi-desnatado e desnatado. Valores de RFV de 450 eram correspondentes a aproximadamente 0,2ng/mL de enterotoxina. A mesma relação foi usada para estimativa da quantidade de SEB, SEC, SED e SEE, visto que a diferença entre as

proteínas é irrisória, é provável que o cálculo estabelecido para SEA seja reprodutível para as outras SE.

Nossos dados indicam a produção de 6ng/mL de SE por *S. aureus* e *S. xylosus*. Estas quantidades não apresentam risco para a manifestação de sintomas epidemiológicos de acordo com diversos autores (Evenson *et al*, 1988; Bergdoll, 1989; Asao *et al*, 2003; Ostyn *et al*, 2010). Porém, Pereira e colaboradores (1991) relatam que 1ng/g de enterotoxina produzida por *S. aureus* seria capaz de causar intoxicação.

Visto que o ensaio de detecção não especifica a SE encontrada, foi proposta a identificação e quantificação da expressão dos genes codificadores de SEA-SEE, a partir da técnica de PCR quantitativo.

A detecção de SEs em matrizes alimentares é extremamente difícil, visto que geralmente as enterotoxinas estão presentes em baixas quantidades (0,05-20ng/g, Le Loir e Gautier, 2010) e o alimento pode conter outras proteínas interferindo na detecção, levando a resultados falsos (Salmain *et al*, 2012). Devido à alta especificidade, mesmo em matrizes alimentares contaminadas, a utilização do qPCR é uma ferramenta útil para detecção de *S. aureus* produtores de SE (Fusco *et al*, 2011).

A maioria dos surtos de intoxicação estafilocócica notificados é relacionada à presença de SEA (Balaban e Rasooly, 2000). Porém, não é realizada a análise para expressão de outros genes relacionados à produção de enterotoxina. Nossos resultados indicam que todos os isolados testados eram capazes de produzir os 7 tipos de SE testados, em menor ou maior quantidade. Foi averiguada a prevalência da expressão do gene *sed*, codificador para SED.

Os dados obtidos indicam que a SED pode exercer papel fundamental em surtos de intoxicações alimentares no Brasil. Veras e colaboradores (2008) afirmam que a maioria dos surtos envolvendo *Staphylococcus* comumente estão associados a SEA e SED.

Uma vez que todos os genes foram expressos, podemos incidir que o valor RFV encontrado no ensaio ELFA miniVIDAS é correspondente à detecção de todas as SE produzidas pelo isolado analisado.

As SE são geralmente produzidas no fim da fase exponencial de crescimento ou início da fase estacionária (Hennekinne *et al*, 2012), com exceção da SEA, produzida

no meio da fase exponencial (Tremaine *et al*, 1993). Com o conhecimento da SE envolvida, pode-se realizar uma predição mais segura do tempo de produção da mesma, e consequentemente aumentar a segurança microbiológica dos alimentos.

O uso conjunto de técnicas bioquímicas (ELFA) e técnicas bio-moleculares (qPCR) pode ajudar a elucidar o papel das SE em DVAs, como a quantidade mínima de ingestão necessária para iniciar o quadro sintomatológico da enfermidade e a variante de enterotoxina envolvida.

5. Agradecimentos

Agradecimento à equipe do Laboratório de Neuroimunomodulação, do Instituto de Biologia, Unicamp.

6. Referências

ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiol Infect**, 130, p.33–40.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. **Int J Food Microbiol**, 61, p.1–10.

BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. (1998). Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.2548-2553.

BERGDOLL, M.S. 1989. *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Bacterial Pathogens** (Doyle MP, ed), p. 463–523. Marcel Dekker Inc., New York, Basel.

CHA, J.O.; LEE, J.K.; JUNG, Y.H.; YOO, J.I.; PARK, Y.K.; KIM, B.S.; LEE, Y.S. 2006. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. **Journal of Applied Microbiology**, 101, p.864–871.

ELAUME, H.; JABBOURI, S. (2004). Comparison of two standardization methods in real time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during in vitro growth. **Journal of Microbiological Methods**, v.59, p.363-370.

EVENSON, M.L.; HINDS, M.W.; BERNSTEIN, R.S.; BERGDOLL, M.S. 1988 Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **Int J Food Microbiol**, 7, p. 311–316.

DUQUENNE, M.; FLEUROT, I.; AIGLE, M.; DARRIGO, C.; BOREZEÉ-DUPONT, E.; DERZELLE, S.; BOUIX, M.; DEPERROIS-LAFARGE, V.; DELACROIX-BUCHET, A. (2010). Tool for quantification of staphylococcal Enterotoxin gene expression in cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.1367-1374.

FUSCO, V.; QUERO, G.M.; MOREA, M.; BLAIOTTA, G.; VISCONTI, A. (2011). Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the Enterotoxin gene cluster (*egc*) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p.528-537.

HENNEKINNE, J.A.; DE BUYSER, M.L.; DRAGACCI, S. 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, 36, p.815-836.

JOHNSON, W.M., TYLER, S.D., EWAN, E.P., ASHTON, F.E., POLLARD, D.R. AND ROZEE, K.R. (1991) Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 29, 426–430.

KÉROUANTON, A.; HENNEKINNE, J.A.; LETERTRE, C.; PETIT, L.; CHESNEAU, O.; BRISABOIS, A.; DE BUYSER, M.L. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International Journal of Food Microbiology**, 115, p.369–375.

LE LOIR, Y.; GAUTIER, M. (2010). Editions. In Tec & Doc. (Ed.), *Staphylococcus aureus*. Paris, France: Médicales Nationales. p.283.

OSTYN, A.; DE BUYSER, M.L.; GUILLIER, F.; GROULT, J.; FÉLIX, B.; SALAH, S.; DELMAS, G.; HENNEKINNE, J.A. 2010. First evidence of a food-poisoning due to staphylococcal enterotoxin type E in France. **Eurosurveillance** 15: 19528.

PEREIRA, J.L.; SALZBERG, S.P.; BERGDOLL, M.S. (1991). Production of staphylococcal enterotoxin D in foods by low Enterotoxin producing staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v.14, p.19-25.

SALMAIN, M.; GHASEMI, M.; BOUJDAY, S.; PRADIER, C.M. (2012). Elaboration of reusable immunosensor for the detection of staphylococcal Enterotoxin A (SEA) in milk with a quartz crystal microbalance. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.173, p.148-156.

SCHMID, D.; FRETZ, R.; WINTER, P.; MANN, M.; HÖGER, G.; STÖGER, A.; RUPPITSCH, W.; LADSTÄTTER, J.; MAYER, N.; DE MARTIN, A.; ALLERBERGER, F. 2009. Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. **Wien. Klin. Wochenschr.**, 121, 125–131.

STESSL, B.; WAGNER, M. (2013). Real-time PCR detection of FoodBorne pathogenic *Staphylococcus aureus*. **Real-Time PCR in Food Science: Current Technology and Applications**. Ed. David Rodriguez Lázaro, Caister Academic Press.

TREMAINE, M.T.; BROCKMAN, D.K.; BETLEY, M.J. (1993). Staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression is not affected by the accessory gene regulator (agr). **Infection and Immunity**, 61(1), p.356-359.

VERAS, J.F.; DO CARMO, L.S.; TONG, L.C.; SHUPP, J.W.; CUMMINGS, C.; DOS SANTOS, D.A.; CERQUEIRA, M.M.; CANTINI, A.; NICOLI, J.R.; JETT, M.A. 2008. Study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Disease**, 12, p.410–415.

CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A primeira parte do projeto objetivou traçar o perfil de contaminação em instalações de cozinhas institucionais e residenciais. Cinquenta e sete isolados de diferentes espécies de *Staphylococcus* foram identificados, sendo 6 deles capazes de produzir enterotoxinas em meio líquido de cultura (10,52%). Ficou evidente a falta de antissepsia e boas práticas de manipulação por parte das cozinheiras das creches. Infelizmente, a palestra ministrada entre as visitas nas creches não resultou em diminuição significativa das contagens de *Staphylococcus* spp. Fato que deve ser levado em consideração é a mudança constante na equipe responsável pelo preparo das refeições.

O caminho mais evidente da contaminação seria a migração do micro-organismo a partir das mãos para geladeiras, facas e tábuas de corte, seguindo para o alimento pronto para o consumo. A contaminação cruzada dificulta a eliminação do micro-organismo, permitindo a presença da enterotoxina nos alimentos mesmo após seu cozimento.

A segunda parte da pesquisa objetivou descrever o Tempo para Produção de Toxinas (TPT) utilizando os isolados recuperados previamente. Seis isolados produtores de Enterotoxina Estafilocócica (SE) em meio de cultura não foram capazes de reproduzir o defeito no alimento testado (carne de frango). Portanto, foi utilizada para elaboração dos planejamentos experimentais a linhagem ATCC 13565, produtora de SEA.

A temperatura demonstrou ser a barreira mais eficiente para retardar ou impedir a produção de toxina. O pH e concentração de NaCl, ambos dentro da faixa de variação existente em carne de frango e do utilizado na carne industrializada pronta para o consumo, não demonstraram efeito significativo no incremento do TPT. Utilizando-se o conceito da Teoria das Barreiras, a utilização em conjunto da temperatura e concentração de NaCl exerce efeito significativo no TPT, incrementando esse tempo.

Por fim, pôde-se observar a falta de pesquisas correlacionando a predição do TPT, ou limites de produção/não produção de toxinas em matrizes alimentares

específicas. A construção de um modelo de regressão logística, baseado na interface produção/não produção de enterotoxinas será realizada posteriormente.

A terceira parte da pesquisa objetivou quantificar a expressão dos genes codificadores de SE dos isolados recuperados das cozinhas institucionais. A técnica de PCR Real Time Quantitativo mostrou-se eficiente ao quantificar e comparar a expressão gênica de cada um dos genes analisados. Os dados foram colhidos a partir da fase estacionária de crescimento bacteriano.

Experimentos futuros serão desenvolvidos com a intenção de se analisar a expressão gênica nas fases *lag* e exponencial. A leitura destes dados permite o melhor conhecimento do perfil dos isolados encontrados no ambiente e como cada enterotoxina se expressa ao longo do tempo, possibilitando desenvolver novos modelos que possam aumentar a segurança microbiológica dos alimentos. Além disso, a utilização de técnicas moleculares, como o PCR, em adição às técnicas tradicionais imunoenzimáticas, permite uma melhor compreensão da epidemiologia da intoxicação causada por SEs.

APÊNDICE 1 – Análise estatística
Faca de corte

Resultado	Amostra 1	Amostra 2
Tamanho da amostra	4	4
Soma dos Postos (Ri)	100.0	36.0
Mediana =	2.50	0.00
U =	0.00	
Z(U) =	3.3607	
p-valor (bilateral) =	0.0008	

Pia

Resultado	Amostra 1	Amostra 2
Tamanho da amostra	4	4
Soma dos Postos (Ri)	64.0	72.0
Mediana =	1.00	1.50
U =	28.00	
Z(U) =	0.4201	
p-valor (bilateral) =	0.6744	

Tábua de corte

Resultado	Amostra 1	Amostra 2
Tamanho da amostra	4	4
Soma dos Postos (Ri)	64.0	72.0
Mediana =	1.00	1.50
U =	28.00	
Z(U) =	0.4201	
p-valor (bilateral) =	0.6744	

Maçaneta da geladeira

Resultado	Amostra 1	Amostra 2
Tamanho da amostra	4	4
Soma dos Postos (Ri)	54.0	82.0
Mediana =	1.50	3.00
U =	18.00	
Z(U) =	1.4703	
p-valor (bilateral) =	0.1415	

Botão de acionamento do fogão

Resultado	Amostra 1	Amostra 2
Tamanho da amostra	4	4
Soma dos Postos (Ri)	76.0	60.0
Mediana =	0.00	0.00
U =	24.00	
Z(U) =	0.8402	
p-valor (bilateral) =	0.4008	

Pano de prato

Resultado	Amostra 1	Amostra 2
Tamanho da amostra	4	4
Soma dos Postos (Ri)	58.0	78.0
Mediana =	1.00	2.50
U =	22.00	
Z(U) =	1.0502	
p-valor (bilateral) =	0.2936	

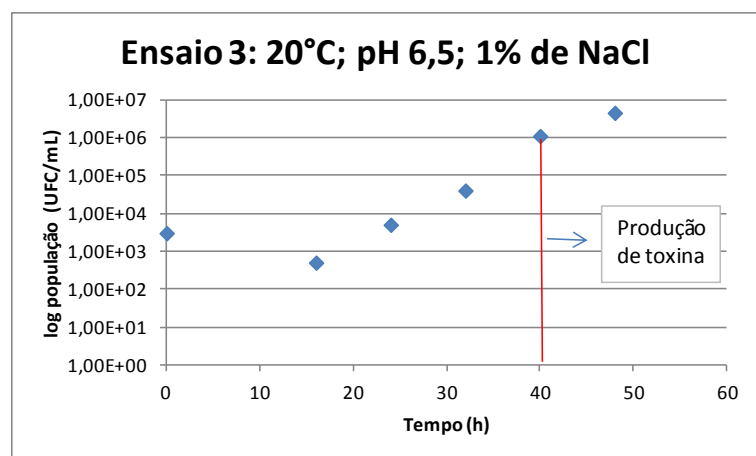
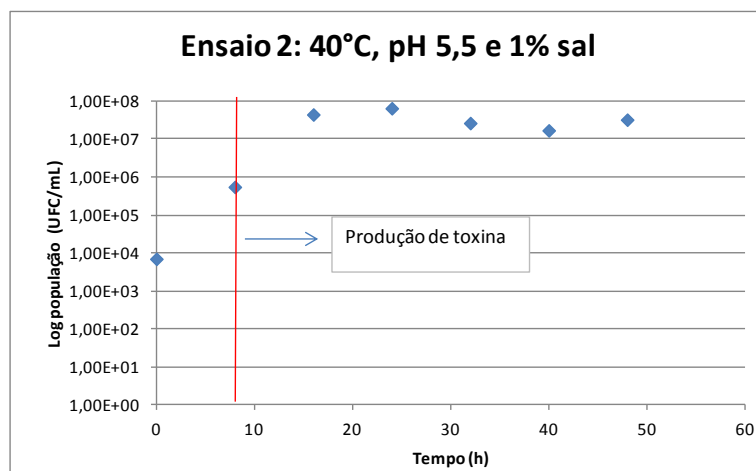
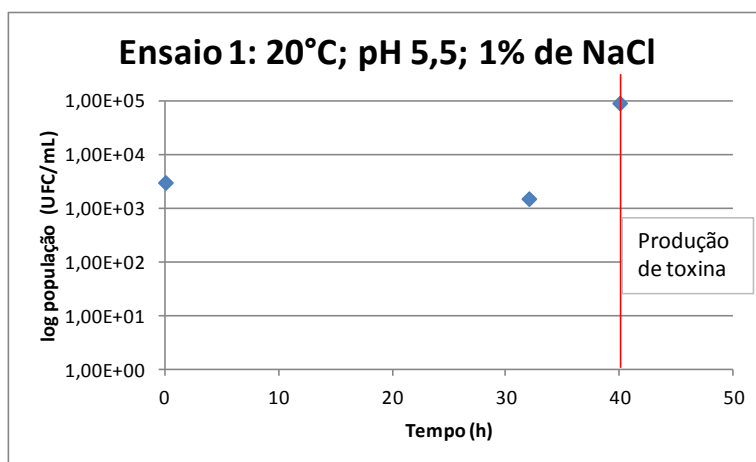
Mãos

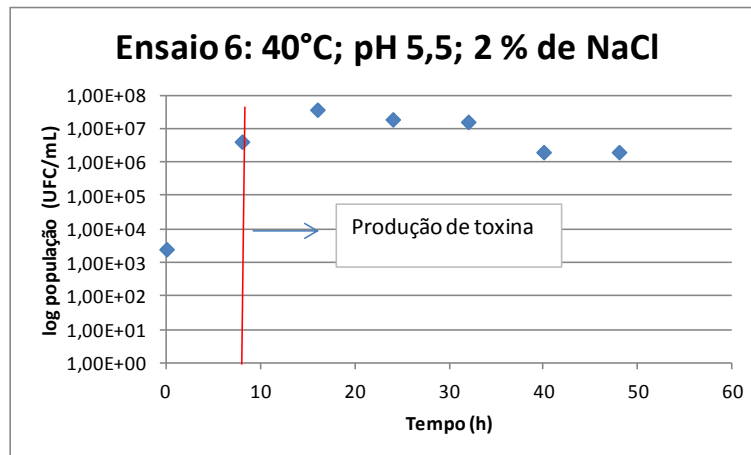
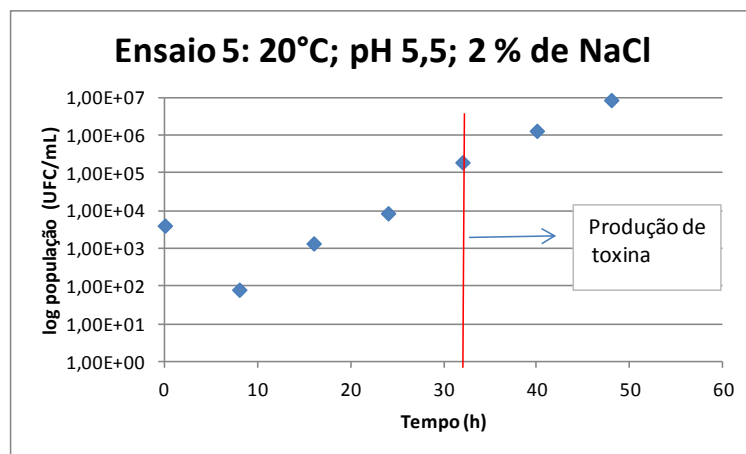
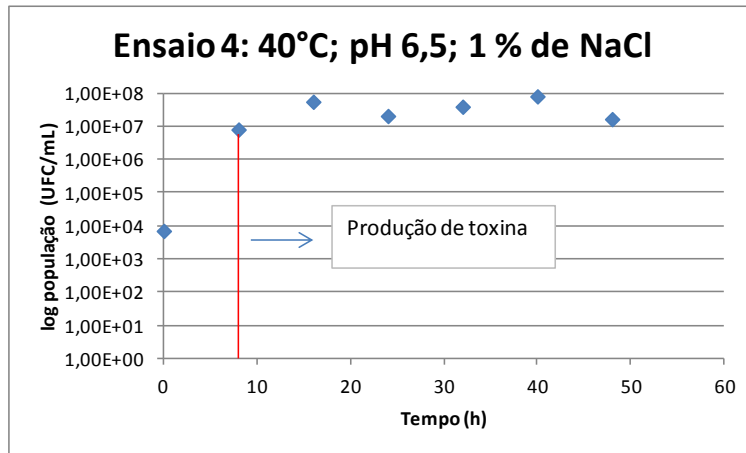
Resultado	Amostra 1	Amostra 2
Tamanho da amostra	4	4
Soma dos Postos (Ri)	68.0	68.0
Mediana =	1.50	1.00
U =	32.00	
Z(U) =	0.0000	
p-valor (bilateral) =	1.0000	

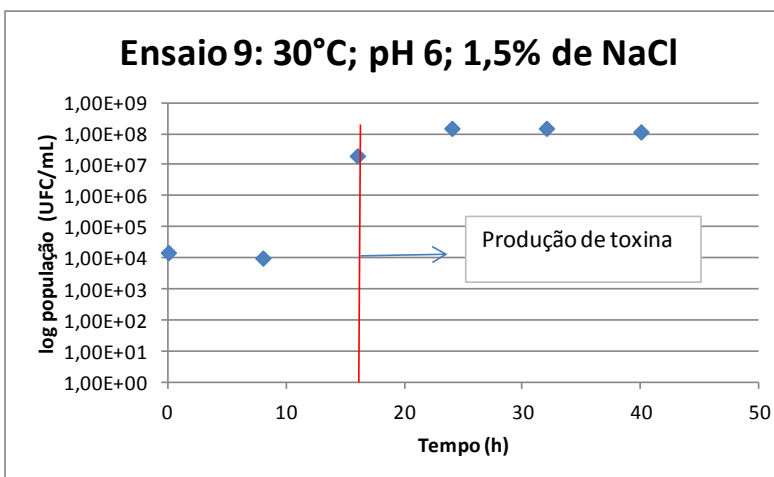
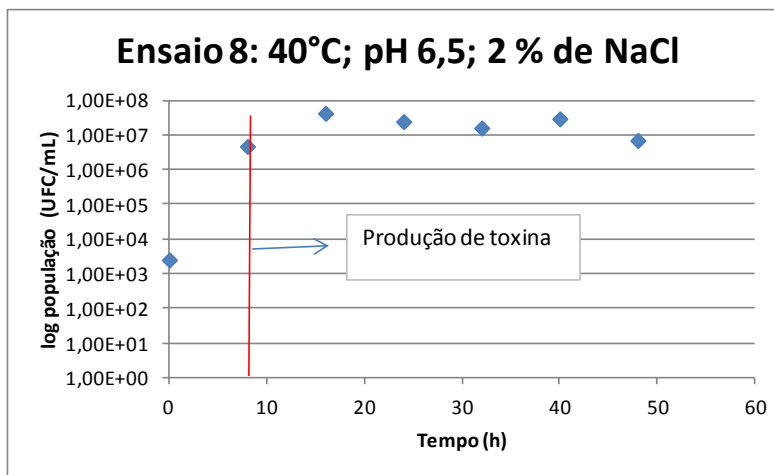
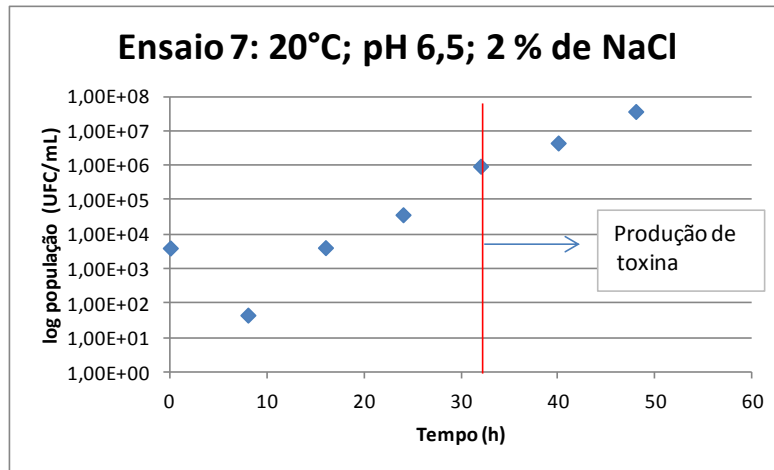
Narinas

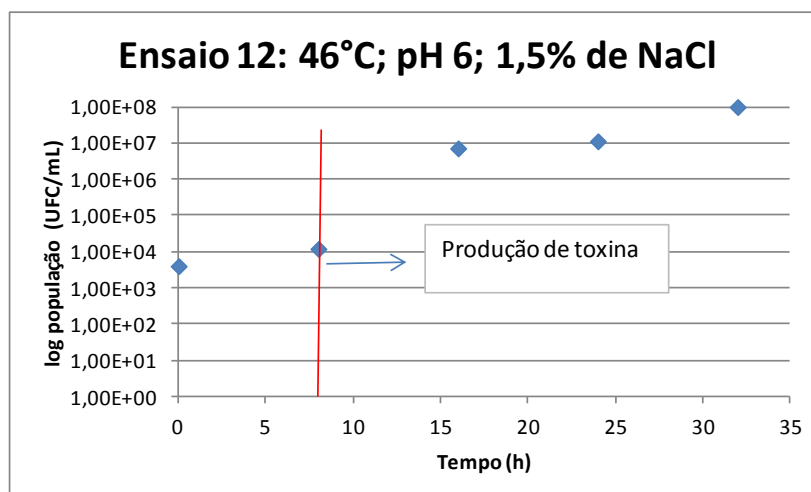
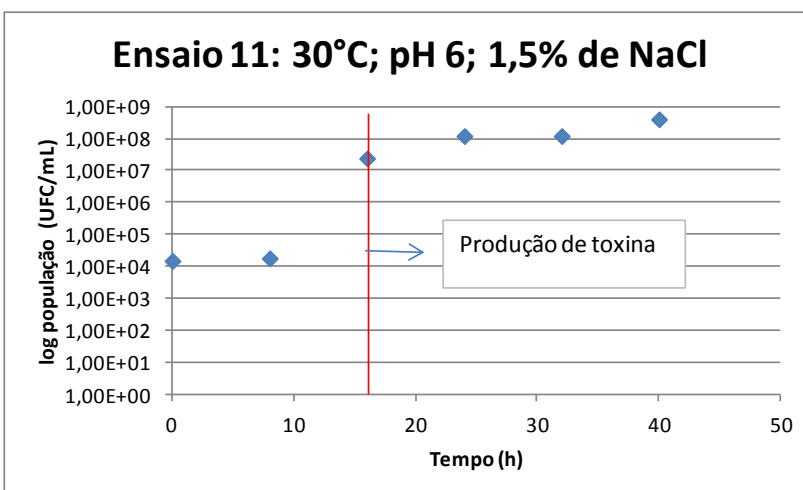
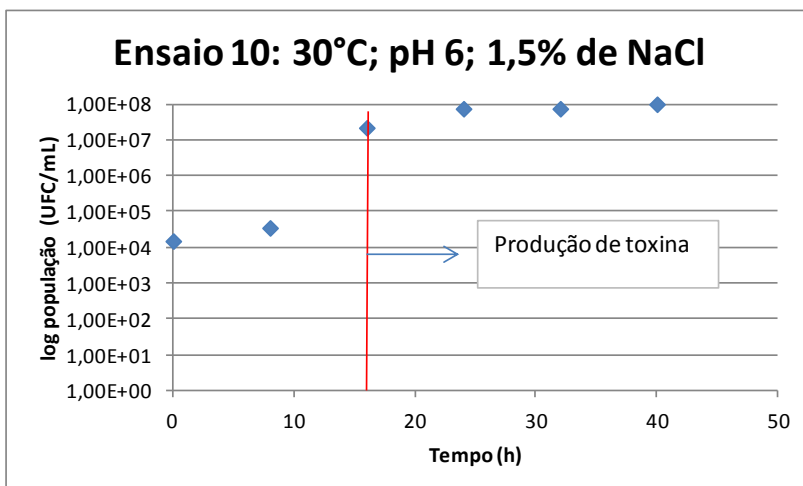
Resultado	Amostra 1	Amostra 2
Tamanho da amostra	4	4
Soma dos Postos (Ri)	54.0	82.0
Mediana =	2.00	2.00
U =	18.00	
Z(U) =	1.4703	
p-valor (bilateral) =	0.1415	

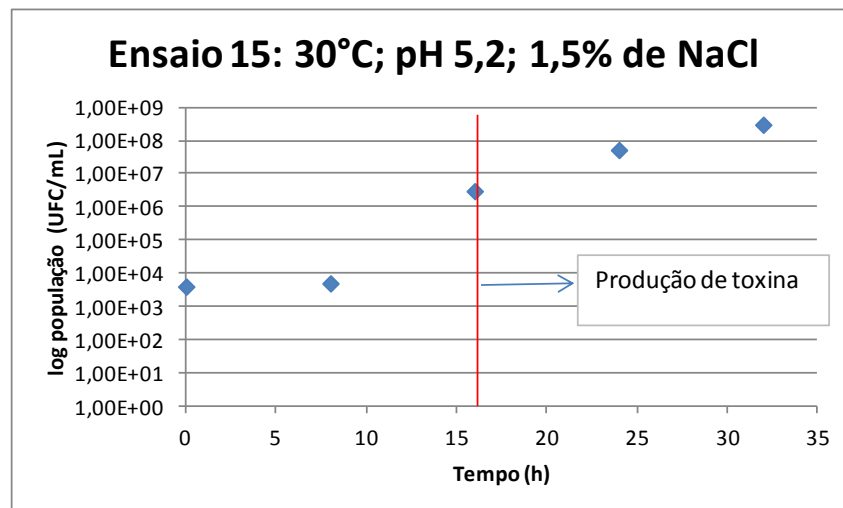
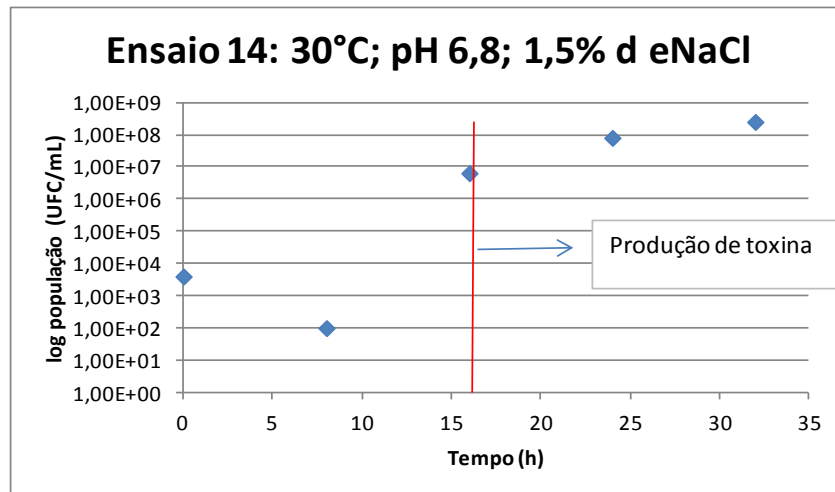
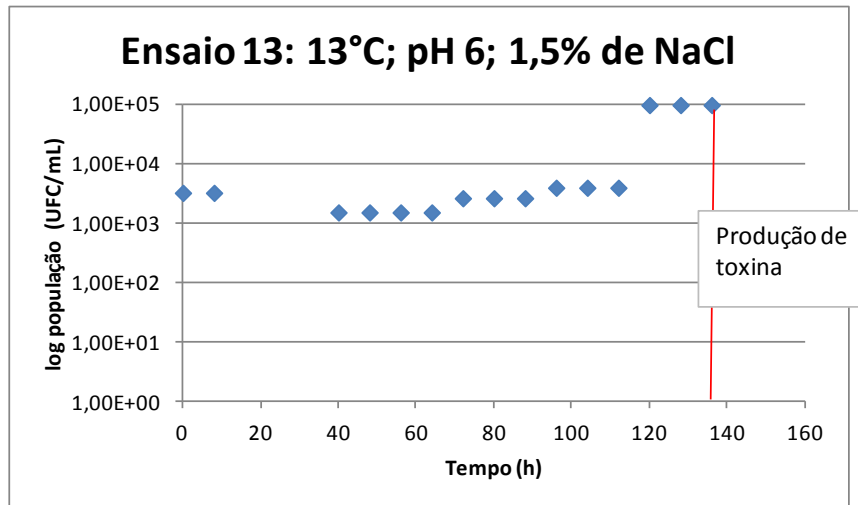
APÊNDICE 2 – A. variação da população de *Staphylococcus* ao longo do tempo e do TPT
(Temperaturas mais altas)

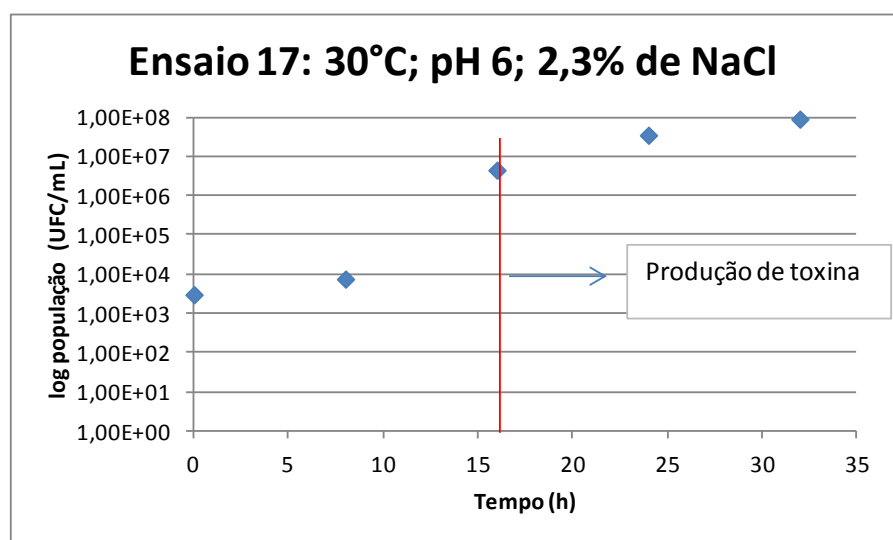
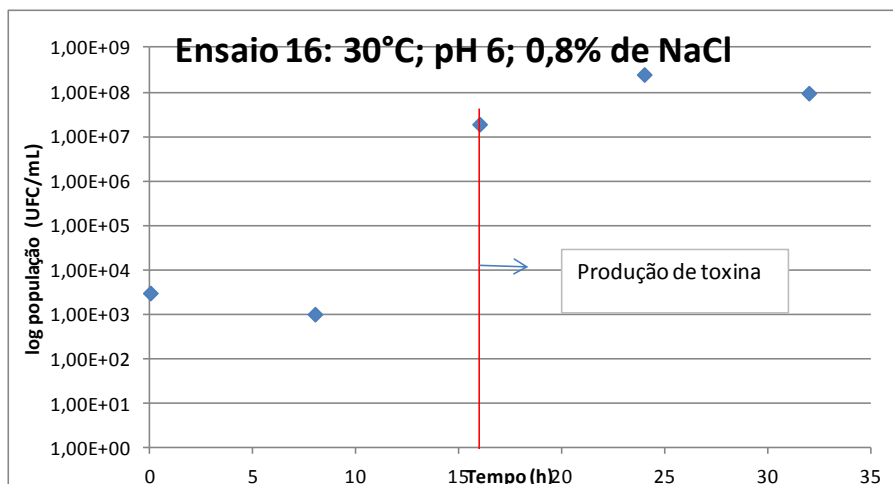




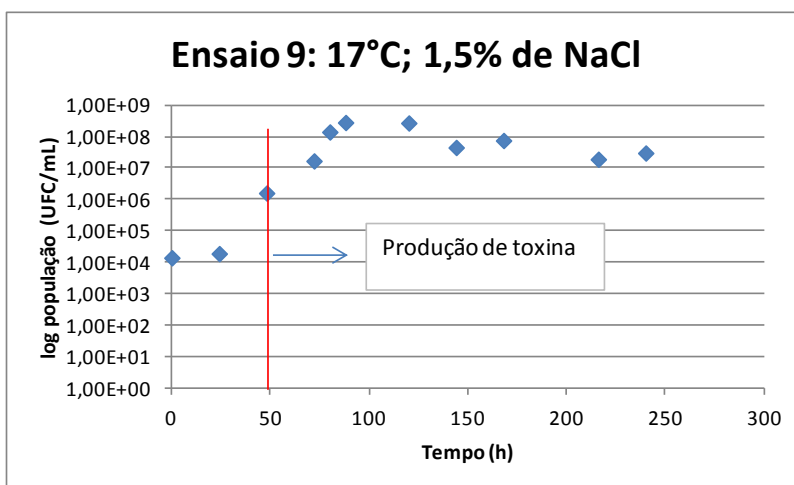
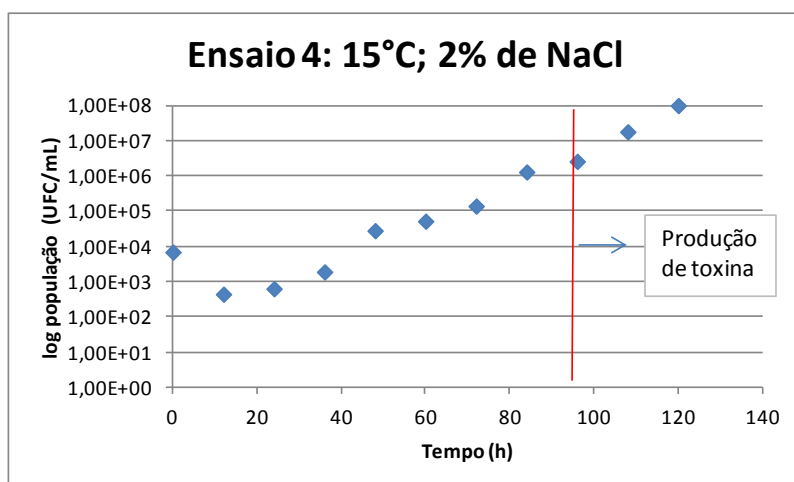
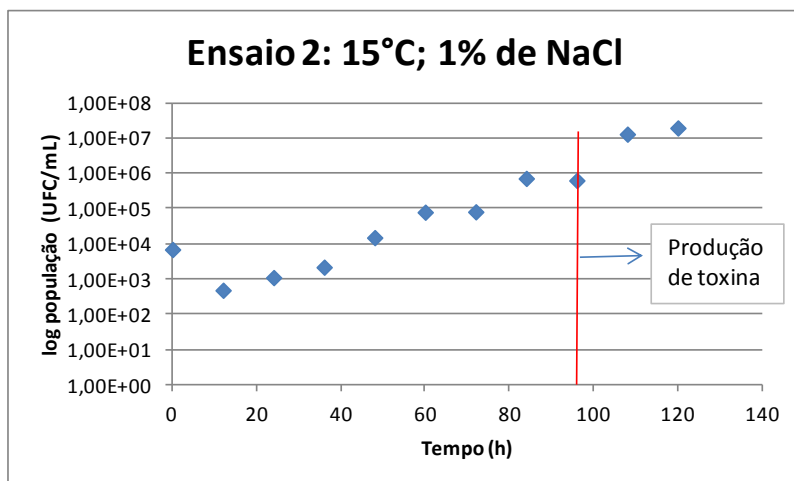




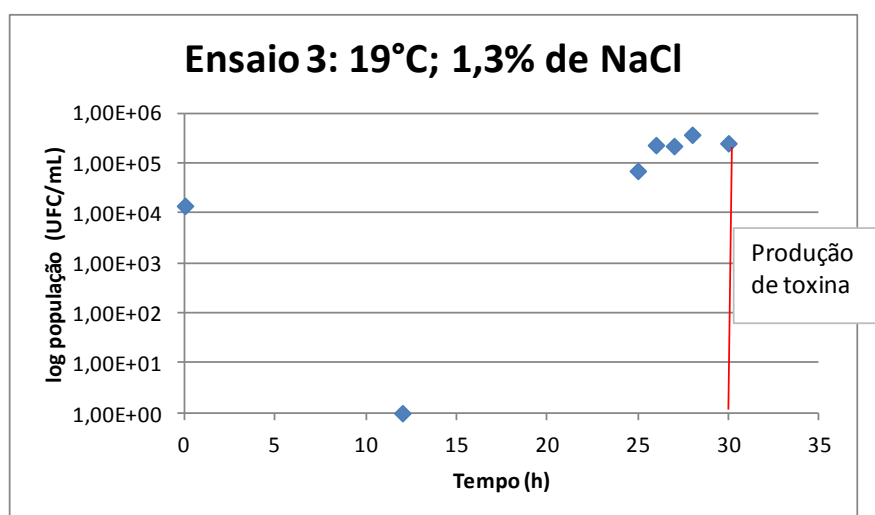
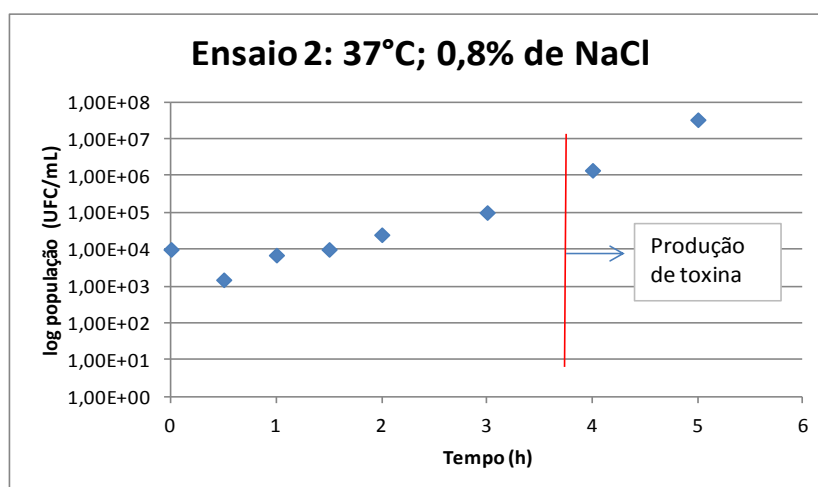
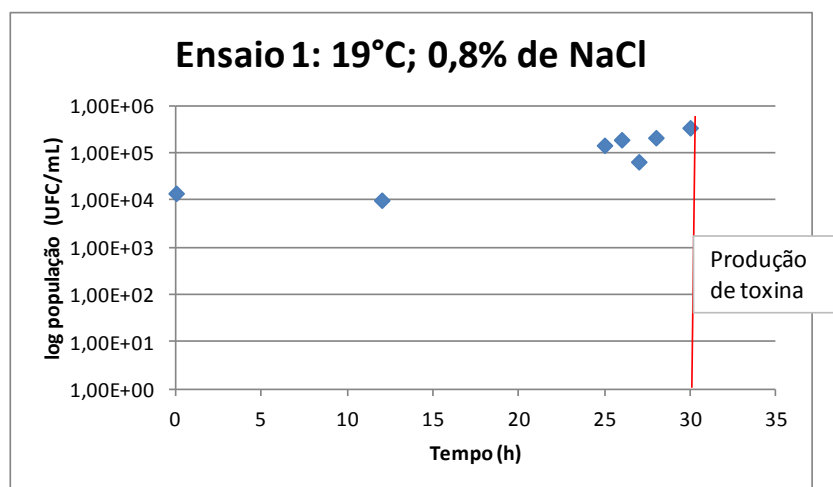


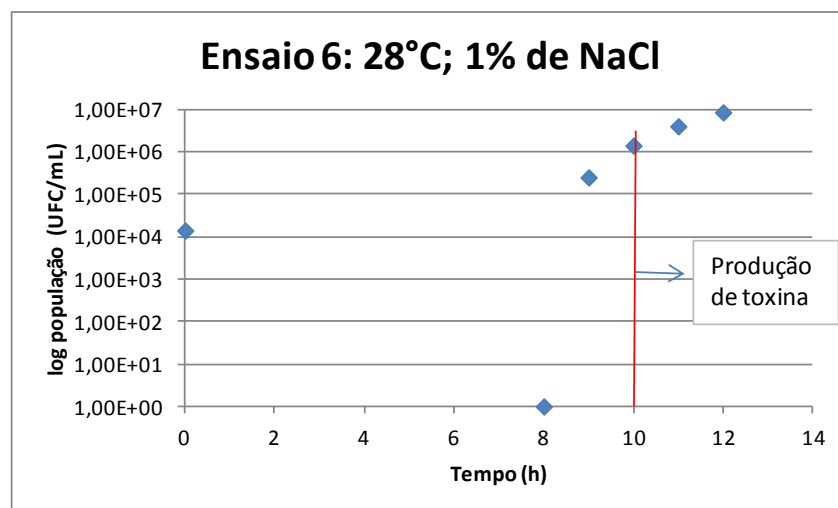
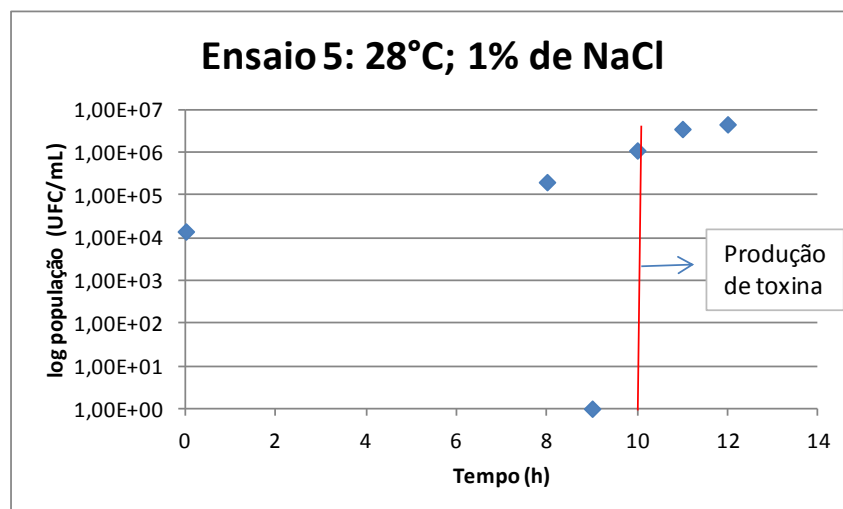
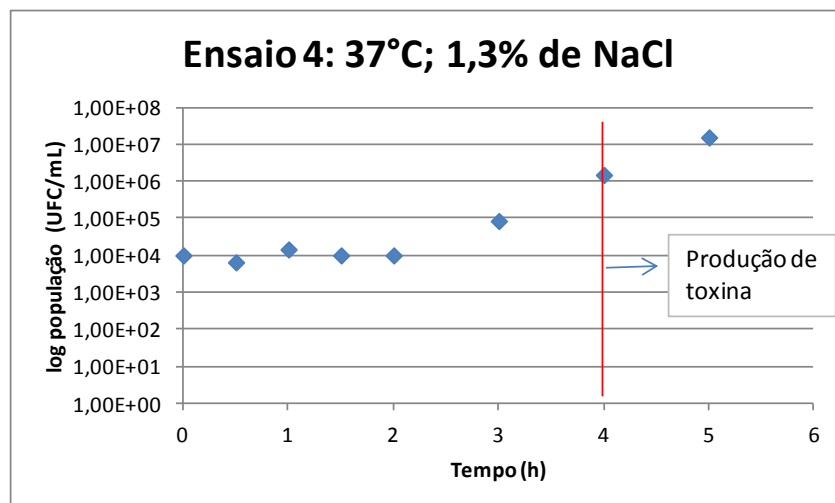


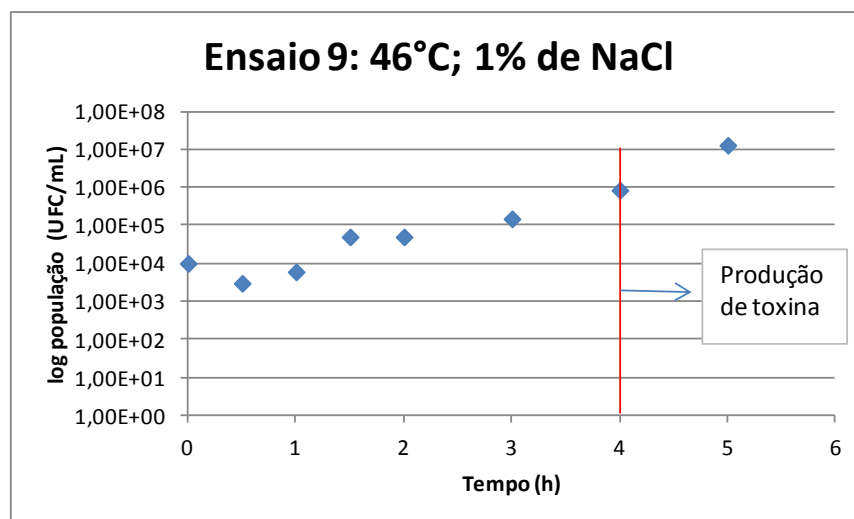
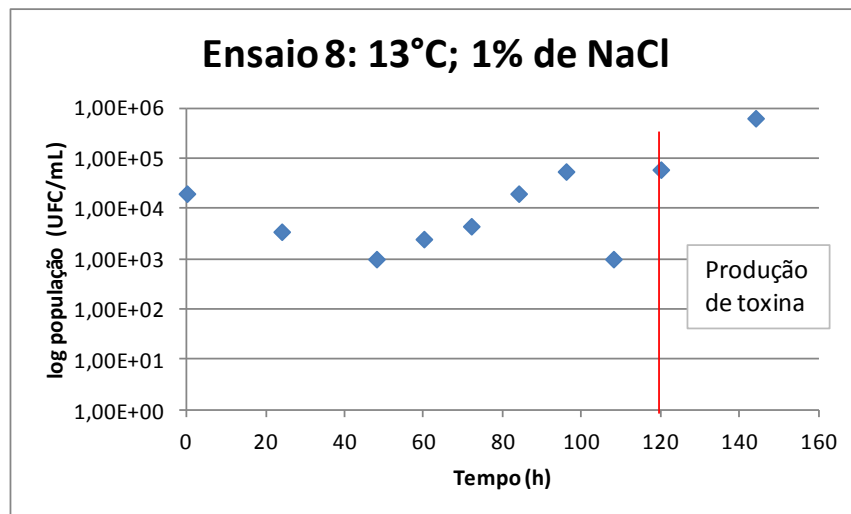
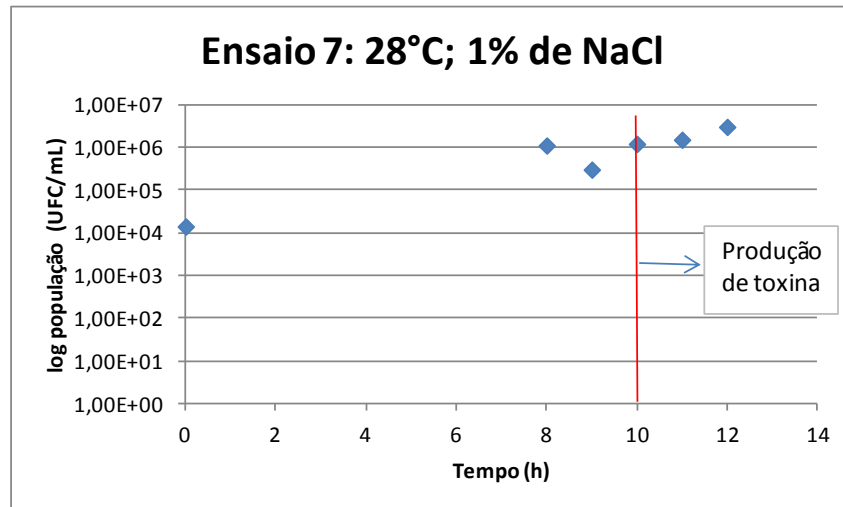
B. Variação da população de *Staphylococcus* ao longo do tempo e do TPT (Temperaturas mais baixas).

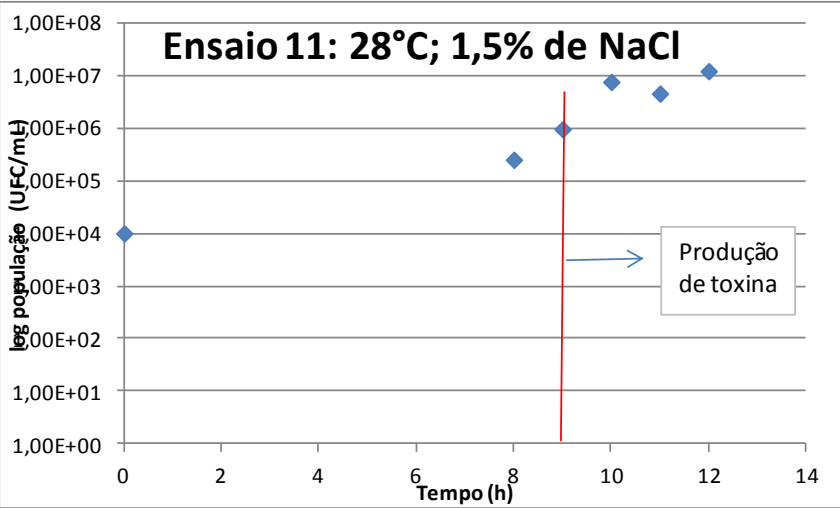
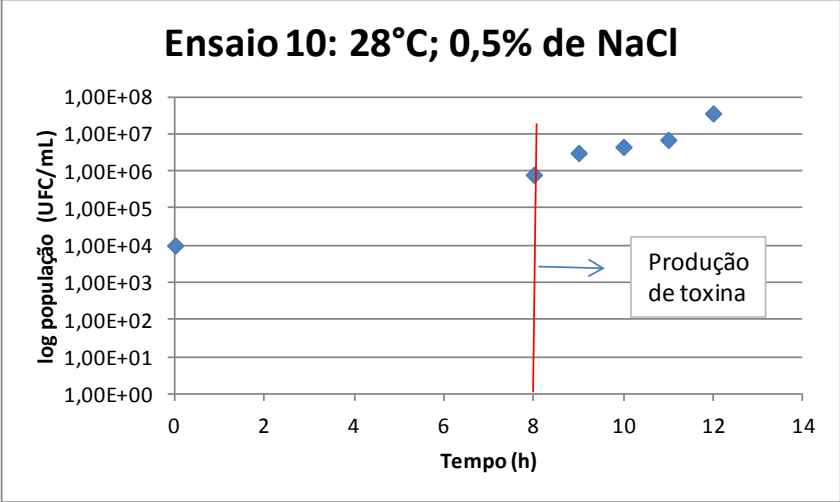


C. Variação da população de *Staphylococcus* ao longo do tempo e do TPT (Temperaturas baixas e altas)









ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título da pesquisa: **“Levantamento da flora microbiana de ambientes e manipuladores de alimentos em instituições de ensino infantil do município de Campinas”**

Pesquisador responsável: Rafael Djalma Chaves (apresentação do TCLE)

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Pereira (FEA/UNICAMP)

JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

De acordo com dados apresentados pelo Ministério da Saúde, em 4 de Setembro de 2009, de 1999 a 2009 foram notificados 6.349 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), envolvendo 123.917 doentes e 70 mortes.

A maioria de novos casos é de crianças até 4 anos. As bactérias mais comuns são, em primeiro lugar, a *Salmonella* spp. (42,5%) e em seguida *Staphylococcus* spp. (20,5%). As bactérias *Staphylococcus* spp podem estar presentes nas nossas mãos e nariz. Essas bactérias podem causar dores de estômago, vômitos e diarreias. Ainda de acordo com os dados, as escolas e creches representam o terceiro local mais frequente de aparecimento dessas doenças (10,6%). Em primeiro lugar estão as residências (45,4%) e em segundo os restaurantes (19,8%).

OBJETIVOS

- Mostrar aos trabalhadores a importância de manter a cozinha e os alimentos bem limpos.
- Analisar que bactérias podem estar presentes nos locais de preparo dos alimentos.
- Analisar se existem bactérias nas refeições servidas.

Rubrica

Pesquisador:

Responsável pela creche:

Sujeito de pesquisa:

METODOLOGIA

Para nossa pesquisa, passaremos cotonetes e esponjas umidecidas em soro fisiológico em diversos locais de trabalho, sendo eles:

- Local de recebimento dos alimentos;
- Local de armazenagem dos alimentos;
- Local de preparo dos alimentos;
- Utensílios usados no preparo dos alimentos;
- Amostra do alimento.

Passaremos o cotonete também nas mãos e narinas dos manipuladores. **NÃO HÁ RISCO PREVISÍVEL OU DESCONFORTO PARA AS SENHORAS VOLUNTÁRIAS PARTICIPANTES DA PESQUISA. NÃO HAVERÁ TAMBÉM NENHUM GASTO FINANCEIRO POR PARTE DAS VOLUNTÁRIAS.**

BENEFÍCIOS

Os resultados da pesquisa podem nos ajudar a melhorar as condições de distribuição, armazenagem e preparo das refeições, evitando doenças transmitidas por alimentos.

Além disso, com a permissão dos responsáveis pela creche, será apresentada uma pequena palestra sobre boas práticas de manipulação e armazenagem de alimentos para os funcionários responsáveis pela alimentação das crianças.

Rubrica

Pesquisador:

Responsável pela creche:

Sujeito de pesquisa:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

- Os pesquisadores envolvidos se colocam a disposição para responder qualquer dúvida a qualquer hora;
- Em uma parte do nosso trabalho, queríamos passar um cotonete umidecido nas mãos e na entrada do nariz das senhoras. A participação das senhoras na nossa pesquisa não vai causar nenhum problema ou tipo de ferimento ou dor. O algodão que passaremos nas mãos e nariz das senhoras é estéril, ou seja, nunca foi usado e está limpo, sem bactérias;
- Em qualquer momento do nosso trabalho, as senhoras podem desistir e não querer mais participar da pesquisa. Se as senhoras não quiserem, não passaremos o algodão em suas mãos e nariz;
- Nenhuma informação da pesquisa será divulgada nos jornais, televisão ou rádio. As senhoras não precisam falar o nome de vocês. A gente também não vai anunciar o nome da creche. Vamos chamá-la de A, B, C, D ou E. Dessa maneira, ninguém vai saber que as senhoras participaram da pesquisa;
- As senhoras não vão passar por nenhuma situação de constrangimento ou de vergonha; As senhoras não vão gastar nenhum dinheiro participando da nossa pesquisa;
- Vamos deixar uma cópia desta carta para cada uma das senhoras.
- Quaisquer dúvidas que as senhoras tenham depois da nossa visita, podem entrar em contato com a gente, nos telefones e endereços abaixo.

Endereço dos pesquisadores: Rua Monteiro Lobato, nº80. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos. Laboratório de Toxinas Microbianas, UNICAMP, Campinas – SP. Telefone: (19) 3521 – 4012. e-mail: chaves@fea.unicamp.br

Para denúncias e/ou reclamações referentes aos aspectos éticos da pesquisa, entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisa/FCM/UNICAMP
Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126. CEP 13083-887 Campinas-SP
Telefone: (19) 3521 – 8936 ou 3521 – 7187. e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Rubrica

Assinatura

Pesquisador:

Responsável pela creche:

Sujeito de pesquisa:

Responsável pela creche:

Sujeito de pesquisa:

Campinas, de _____ de 201_.