

**JOÃO VÍCTOR BALESTRIN SARTOR**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO MODELO DE LUEDEKING-PIRET-MONOD  
PARA A PREDIÇÃO DE PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS POR  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Weber da Silva Robazza

Coorientador: Prof. Dr. Alessandro Cazzonato Galvão

**PINHALZINHO**

**2019**

JOÃO VÍCTOR BALESTRIN SARTOR

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO MODELO DE LUEDEKING-PIRET-MONOD PARA A PREDIÇÃO DE PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*/ JOÃO VÍCTOR BALESTRIN SARTOR. – PINHALZINHO, 2019-90p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Weber da Silva Robazza

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina  
Centro de Educação Superior do Oeste  
Programa de Pós-Graduação, 2019.

1. Palavra-chave1. 2. Palavra-chave2. 2. Palavra-chave3. I. Orientador. II. Universidade xxx. III. Faculdade de xxx. IV. Título

**JOÃO VÍCTOR BALESTRIN SARTOR**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO MODELO DE LUEDEKING-PIRET-MONOD  
PARA A PREDIÇÃO DE PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS POR  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau em Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Banca examinadora**

Orientador:

---

**Weber da Silva Robazza**

Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Membros:

---

**Christian Luiz da Silveira**

Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

---

**João Paulo Bender**

Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Pinhalzinho, 04 junho de 2019



## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Weber da Silva Robazza, por sua dedicação, paciência e zelo ao longo de toda minha jornada acadêmica. Sem seu auxílio, não teria chego até aqui. Agradeço também à sua esposa, Denise Ortigosa Stolf, pela paciência, preocupação e por não demonstrar insatisfação durante minhas longas ligações noturnas.

Aos amigos do CH, que em muitas vezes fizeram papel de família.

Ao meu amigo de longa data, Emílio Matheus Machado, por me mostrar que nem toda linha de código é tão assustadora quanto parece.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - PPGCTA, pela oportunidade.

E principalmente aos meus pais, Rone Sartor e Leomara Maria Balestrin Sartor, por terem acreditado na minha capacidade quando eu mesmo duvidava; por terem insistido e me ajudado a levantar quando cai; e por terem me guiado pelo caminho da persistência, resiliência, bondade e honestidade. Avançar nem sempre é fácil, mas posso chegar à qualquer lugar com vocês ao meu lado.









## RESUMO

O presente estudo visou avaliar a eficiência do modelo de Luedeking-Piret, associado a cinética de crescimento de Monod, na predição do crescimento e produção de enterotoxinas por *S. aureus*. Foram analisadas 55 curvas de crescimento e produção de enterotoxinas retiradas da literatura, as quais tiveram seus dados extraídos e organizados em conjuntos separados, e classificadas com notas de 1 a 4, de acordo com suas características específicas. Cada conjunto de dados foi, posteriormente, submetido à duas regressões não-lineares, sendo que a primeira objetivou obter valores referentes a concentração de *S. aureus*, enquanto a segunda obteve valores referentes a produção de enterotoxina. Os resultados obtidos foram então analisados a fim de se avaliar a precisão do modelo, onde se verificou a distribuição dos resultados de cada parâmetros e o cálculo de probabilidade do modelo obter resultados próximos aos valores de referência. Também simulou-se o crescimento de *S. aureus* e produção de enterotoxinas a fim de se obter critérios de comparação ao modelo de LPM, uma vez que os resultados das regressões mostraram-se predominantemente heterogêneos. Por fim, constatou-se que devido a complexidade inerente ao processo de crescimento e produção de enterotoxina estafilocócicas, o modelo LPM não é capaz de descrever com precisão a produção de toxinas, mas pode reproduzir de forma acurada os dados experimentais caso se tenha a disposição, número relativamente razoável de pontos experimentais, além de apresentar solução analítica.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas estafilocócicas, contaminação alimentar.



## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the efficiency of the Luedeking-Piret model, associated with the growth kinetics of Monod, in the prediction of *S. aureus* growth and enterotoxin production. Fifty-five growth and enterotoxin production curves taken from the literature were analyzed, which had their data extracted and organized into separate data sets and were classified with grades 1 to 4, according to their specific characteristics. Each data set was then submitted to two non-linear regressions, the first aim being to obtain values related to *S. aureus* concentration, and the second, values related to enterotoxin production. The results were then analyzed in order to evaluate the accuracy of the model, where the distribution of the results of each parameter and the calculation of probability of the model obtained results close to the reference values was verified. *S. aureus* growth and enterotoxin production were also simulated in order to obtain criteria for comparison to the LPM model, since the regression results were predominantly heterogeneous. Finally, it was found that due to the inherent complexity of the staphylococcal enterotoxin growth and production process, the LPM model is not able to accurately describe the production of toxins, but can accurately reproduce the experimental data if a relatively reasonable number of experimental points is available, in addition to presenting an analytical solution.

**Keywords:** Staphylococcus aureus, staphylococcal enterotoxins, food contamination.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Número de surtos de DTA por ano e intensidade de indivíduos expostos durante o mesmo período. . . . .	34
Figura 2 – Número de indivíduos expostos a DTAs por ano e intensidade de casos de adoecimento durante o mesmo período. . . . .	35
Figura 3 – Número de surtos de DTA's por região. . . . .	36
Figura 4 – Evolução do procedimento de registros de surtos de DTA's por região. . . . .	38
Figura 5 – Alimentos mais comuns envolvidos em casos de contaminação estafilocócica no Brasil. . . . .	40
Figura 6 – Locais mais comuns envolvidos em casos de contaminação estafilocócica no Brasil. . . . .	41
Figura 7 – Exemplos de curvas de crescimento de SA classificadas de acordo com os critérios de desempenho. . . . .	58
Figura 8 – Exemplos de curvas de produção de SE classificadas de acordo com os critérios de desempenho. . . . .	60
Figura 9 – Distribuição das curvas de crescimento de SA e das curvas de produção de SE classificadas de acordo com os critérios de desempenho. . . . .	61
Figura 10 – Distribuições de probabilidade dos parâmetros $a_1$ , $a_2$ , $b_1$ e $b_2$ para as curvas com nota igual a 4. . . . .	64
Figura 11 – Distribuições de probabilidade dos parâmetros $\alpha$ , $\beta$ , $\mu_{max}$ e $K_s \cdot Y_{x/s}$ para as curvas com nota igual a 4. . . . .	65
Figura 12 – Comparação entre curvas de crescimento de SA e produção de SE em leite a 32 °C. a) Simulação, b) Experimental. . . . .	69
Figura 13 – Comparação entre curvas de crescimento de SA e produção de SE em leite a 23 °C. a) Simulação, b) Experimental. . . . .	71



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características biológicas de Enterotoxinas Estafilocócicas e Enterotoxinas Estafilocócicas semelhantes a superantígeno. . . . .	32
Tabela 2 – Série histórica de surtos de DTA. Brasil, 2000 a 2017. . . . .	33
Tabela 3 – Agentes mais comumente envolvidos em surtos de DTAs no Brasil, no período de 2000 a 2017. . . . .	37
Tabela 4 – Registro de contaminações por SA e SE nos Estados Unidos, entre 2011 à 2016. . . . .	42
Tabela 5 – Curvas de crescimento de <i>S. aureus</i> e de produção de enterotoxinas avaliadas. . . . .	55
Tabela 6 – Critérios de classificação para curvas de crescimento de <i>S. aureus</i> (SA) e produção de enterotoxinas (SE). . . . .	58
Tabela 7 – Resultados dos parâmetros $a_1, a_2, b_1, b_2$ . . . . .	60
Tabela 8 – Percentis para os parâmetros $a_1, a_2, b_1$ e $b_2$ obtidos a partir das curvas com melhores notas. . . . .	62
Tabela 9 – Resultados dos parâmetros $\mu_{max}, K_s \cdot Y_{x/s}, \alpha, \beta$ . . . . .	62
Tabela 10 – Percentis para os parâmetros $\mu_{max}, K_s \cdot Y_{x/s}, \alpha$ e $\beta$ obtidos a partir das curvas com melhores notas. . . . .	63
Tabela 11 – Limites e probabilidades obtidos através da integralização das curvas de densidade de probabilidade para $a_1, a_2, b_1$ e $b_2$ . . . . .	65
Tabela 12 – Limites e probabilidades obtidos através da integralização das curvas de densidade de probabilidade para $\alpha, \beta, \mu_{max}$ e $K_s \cdot Y_{x/s}$ . . . . .	66
Tabela 13 – Resultados das regressões lineares entre o Erro Percentual Médio de SE e demais parâmetros. . . . .	66
Tabela 14 – Resultados das regressões lineares entre o Erro Percentual Médio para $P > 1$ e $P < 1$ e demais parâmetros. . . . .	67
Tabela 15 – Parâmetros para primeira simulação. . . . .	69
Tabela 16 – Parâmetros para a segunda simulação. . . . .	70
Tabela 17 – Resultados da primeira regressão. . . . .	85
Tabela 18 – Resultados da segunda regressão. . . . .	87
Tabela 19 – Resultados dos parâmetros obtidos pelas regressões e notas das curvas analisadas. . . . .	89





## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BP	Teste de Baird-Parker
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CE	Etiologia Confirmada
CHM	Complexo Maior de Histocompatibilidade
DNase	Desoxirribonucleases
DTA	Doenças Transmitidas por alimentos
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPM	Erro Percentual Médio
ESP	Evento de Saúde Pública
IAE	Intoxicações Alimentares Estafilocócicas
INCSSN	International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigen Nomenclature
IgG	Imunoglobulina G
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LPM	Modelos de Luedeking-Piret-Monod
MLSA	Análise de Sequência de Multicocus
MSRA	Multiple-resistant Staphylococcus aureus
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVL	Leucocidina Pantón-Valentine
SA	Staphylococcus aureus
SCC	Cassete cromossômico estafilocócico

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
SE	Enterotoxina Estafilocócica
SEt	Suspeita de etiologia
SEA	Enterotoxina estafilocócica tipo A
SEB	Enterotoxina estafilocócica tipo B
SEC	Enterotoxina estafilocócica tipo C
SED	Enterotoxina estafilocócica tipo D
SEE	Enterotoxina estafilocócica tipo E
SEI	Staphylococcal Enterotoxin-like Superantigens
SFP	Staphylococcal Food Poisoning
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SaPI	ilha de patogenicidade do <i>S. aureus</i>
TNase	Termonuclease
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VE	Vigilância Epidemiológica
UFC	Unidade Formadora de Colônia
pH	potencial Hidrogeniônico

## LISTA DE SÍMBOLOS

$P$	Concentração de enterotoxinas
$X$	Concentração de <i>S. aureus</i>
$t$	Tempo
$\alpha$	Constante de proporcionalidade
$\beta$	Constante de proporcionalidade
$\mu$	Velocidade específica de crescimento
$\mu_{\max}$	Velocidade específica de crescimento máxima
$K_s$	Constante de meia velocidade
$S$	Substrato limitante
$Y_{x/s}$	Constante de rendimento celular
$q_s$	Taxa de consumo de substrato específico
$X_0$	Concentração de <i>S. aureus</i> inicial
$X_{\max}$	Concentração de <i>S. aureus</i> máxima
$k$	Taxa de crescimento específica
$N$	Densidade bacteriana



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO . . . . .	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA . . . . .	25
2.1	Características Gerais do <i>Staphylococcus aureus</i> . . . . .	25
2.2	Enterotoxinas Estafilocócicas (SE) . . . . .	28
2.3	Histórico de contaminação alimentar no Brasil . . . . .	31
2.4	Intoxicação por <i>Staphylococcus</i> . . . . .	39
2.5	Deteção de Enterotoxinas Estafilocócicas . . . . .	43
2.6	Microbiologia Preditiva . . . . .	46
2.7	Modelos matemáticos aplicados ao crescimento de <i>S. aureus</i> . . . . .	47
2.8	Modelo de Luedeking-Piret associado à cinética de crescimento de Monod	48
3	OBJETIVO GERAL . . . . .	51
3.1	Objetivos Específicos . . . . .	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS . . . . .	53
4.1	Dados Experimentais . . . . .	53
4.2	Modelagem Matemática . . . . .	53
4.3	Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> . . . . .	54
4.4	Produção de enterotoxinas estafilocócicas . . . . .	54
4.5	Avaliação dos resultados dos ajustes . . . . .	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . . .	57
5.1	Classificação dos conjuntos de dados . . . . .	57
5.2	Valores de referência . . . . .	63
5.3	Simulações do crescimento de <i>S. aureus</i> e produção de enterotoxinas . . .	68
6	CONCLUSÃO . . . . .	73
	REFERÊNCIAS . . . . .	75
	APÊNDICES	83
	APÊNDICE A – RESULTADOS OBTIDOS COM O MODELO LPM .	85



## 1 INTRODUÇÃO

Intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus* é uma das doenças de origem alimentar mais comuns e que resulta da ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas estafilocócicas. Estes compostos são termoestáveis e quantidades da ordem de 20 a 100 nanogramas de toxina por grama de alimento são suficientes para causar intoxicação (SCHELIN et al., 2011). De acordo com dados oficiais da União Europeia, somente no ano de 2013 foram relatados 386 surtos de contaminação com enterotoxinas estafilocócicas (EFSA; ECDC, 2015).

Um dos problemas para se estimar o risco de contaminação estafilocócica é a pequena quantidade de dados disponíveis na literatura, a qual se deve às dificuldades técnicas e ao alto custo de se mensurar quantidades da ordem de nanogramas de enterotoxinas em alimentos. Em consequência dessa escassez de informações, embora se saiba que a taxa de produção de enterotoxinas depende da concentração de *Staphylococcus* e do seu estágio de crescimento (principalmente nas fases exponencial e estacionária) e da composição do alimento, não são conhecidos maiores detalhes da cinética que descreve o fenômeno.

Na literatura especializada podem-se encontrar modelos preditivos que reproduzem o crescimento de *Staphylococcus aureus* (LEE et al., 2015; TANGO et al., 2016). Entretanto, estes modelos foram elaborados para sistemas específicos e não incluem a previsão de enterotoxinas como uma resposta. Dessa forma, o desenvolvimento de modelos que possam prever com precisão satisfatória a produção de enterotoxinas seria de grande utilidade para a avaliação do risco de contaminação com essas substâncias.

O modelo empírico de Luedeking-Piret foi desenvolvido em 1959 para prever a produção de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii* e tem sido empregado com relativo sucesso para a descrição de diferentes processos fermentativos (GARNIER; GAILLET, 2015). Ele consiste numa equação diferencial que expressa a taxa de produção de produto em função da população bacteriana e de sua taxa de crescimento (LUEDEKING; PIRET, 1959). Para sua aplicação em um dado processo onde há a produção de substâncias por diferentes bactérias, ele deve ser associado a outro modelo que descreve a cinética de crescimento bacteriano. Quando aplicado em conjunto com o modelo de Monod (MONOD, 1949), obtém-se como resultado um modelo que apresenta solução analítica e que pode fornecer informações importantes sobre todo o processo relacionado à produção de metabólitos por bactérias em diferentes situações (GARNIER; GAILLET, 2015).

Neste contexto, o presente estudo tem o objetivo de avaliar a eficácia do modelo de Luedeking-Piret-Monod para prever a produção de enterotoxinas estafilocócicas em diferentes alimentos com o intuito de se generalizar conclusões e verificar o limite de validade dos conhecimentos que se têm sobre este processo até o momento.





## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

O gênero *Staphylococcus* abrange um vasto grupo de bactérias Gram Positivas, não formadoras de esporos, anaeróbicas facultativas, sem mobilidade, catalase-positivas ou negativas, de formato esférico, classificadas como pertencentes à família *Staphylococcaceae*. Esta família contém mais de 40 espécies reconhecidas, as quais se dividem de acordo com a capacidade de sintetizar ou não, a enzima coagulase, sendo a maioria coagulase-negativa, com exceção do *S. aureus*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* (EIFF; BECKER; SKOV, 2015; PFALLER et al., 2015; KWOK, 2003).

Devido à sua importância para a saúde humana e aos riscos de contaminação que oferece, esforços foram dedicados à tipagem e classificação de cepas de *S. aureus*, buscando facilitar sua detecção nas mais variadas condições. Atualmente, dois métodos bastante comuns são empregados na determinação de cepas estafilocócicas. Entretanto, estas técnicas não são completamente precisas: produção de coagulase - uma proteína de secreção que se liga à protrombina do hospedeiro ou de estafiloxantina - um pigmento carotenóide associado à membrana celular (PANIZZI et al., 2006; PELZ et al., 2005).

Considera-se o *S. aureus* como sendo coagulase-positivo, enquanto que as demais espécies do gênero *Staphylococci* são categorizadas como coagulase-negativos. Entretanto, apesar desta afirmação provar-se verdadeira na maioria dos casos, existem cepas específicas de *S. aureus* que não produzem coagulase, bem como, outras espécies do gênero que são capazes de sintetizar esta enzima. Sendo assim, geralmente associa-se a capacidade de produzir coagulase à coloração das colônias para definição da espécie Estafilocócica estudada (BOSE, 2016). A maioria das cepas de *S. aureus* é capaz de produzir Termonuclease (TNase) e, portanto, a detecção deste composto também pode ser utilizada como indicador da presença de *S. aureus* (CASTRO; SILVA; TEIXEIRA, 2018; FETSCH; JOHLER, 2018).

O gênero *Staphylococci* tem seu crescimento favorecido quando hospedado em animais, em intervalo de temperatura compreendido entre 7 °C e 48 °C. A temperatura ótima de crescimento é de cerca de 35 °C e com pH variando entre 7.0 e 7.5, podendo apresentar crescimento em ambientes com pH menor do que 4,5. Podem se desenvolver em baixos níveis de atividade de água - abaixo de 0,8 - e apresentam alta tolerância à presença de sais e açúcares em geral. É comumente associado a intoxicações alimentares, geralmente relacionadas ao consumo de presuntos, tortas e outros alimentos com quantidades variáveis de sal e açúcar (TODD, 2014).

Sua nomenclatura é baseada em seu formato geométrico, já que esta bactéria lembra um cacho de uvas quando observada com auxílio de um microscópio. O próprio termo *Staphylococcus* é na verdade uma junção entre os vocábulos *staphyle* (que pode ser traduzido como "cachos de uvas") e *kokkos* (bagas) (LICITRA, 2013).

O *Staphylococcus aureus* foi identificado pela primeira vez em 1880, pelo cientista Alexandre Ogston. Entretanto, sua relação com infecções alimentares só foi percebida em 1884, por Vaughan e Sternberg, e comprovada em 1914, por Barber, que consumiu propositalmente leite contaminado e desenvolveu infecção estafilocócica. (LIU, 2013; TODD, 2014).

Uma das características mais importantes acerca do *S. aureus* é a sua facilidade em se alastrar pelo ambiente, tornando-se onipresente em todo o globo terrestre. Além disso, é a única bactéria do gênero *Staphylococci* capaz de produzir coagulase - característica associada à produção de toxinas. É normalmente encontrado na pele e mucosas de várias espécies animais - incluindo seres humanos, e é comumente relacionado a infecções de pele, gastroenterites, mastite em animais leiteiros entre outras enfermidades. Acredita-se que animais domésticos possam atuar como vetores de transmissão do *S. aureus*, além de serem susceptíveis à ação infecciosa deste micro-organismo (BIEROWIEC; PŁONECZKA-JANECZKO; RYPUŁA, 2016). No entanto, algumas cepas de *S. aureus* afetam somente hospedeiros animais específicos, não oferecendo riscos a humanos (GRACE; FETSCH, 2018). Shepherd et al. (2013) relatam que cepas de *S. aureus* que habitualmente se beneficiam do organismo humano como hospedeiro já foram encontradas desenvolvendo-se em animais domésticos, mas que a situação inversa é raramente observada.

Drougka et al. (2016) investigaram a prevalência e os parâmetros que podem influenciar a propagação de *S. aureus* entre animais domésticos e equipes veterinárias em contato próximo. Foram avaliadas 120 amostras - 92 cães, 10 gatos e 18 humanos saudáveis, entre abril de 2012 e dezembro de 2013, na região norte da Grécia. Ao fim dos experimentos, foi verificada a prevalência de *S. aureus* em 36,3% dos animais domésticos e em 38,9% dos veterinários que estiveram em contato direto com estes animais. Percebeu-se também que animais de pequeno porte oriundos de áreas rurais são mais suscetíveis à contaminação por esta bactéria. Outro fator interessante mencionado no estudo é que, de todos os casos positivos para contaminação, 26,7% diziam respeito a cepas *Multiple-resistant Staphylococcus aureus* (MSRA). Petinaki e Spiliopoulou (2012) também reportaram a presença de MRSA em animais domésticos de pequeno porte, além de cavalos e animais marinhos, e salientaram a ocorrência de surtos de contaminação estafilocócica em humanos que tiveram suas origens em animais.

Estima-se que os maiores reservatórios de *S. aureus* no corpo humano sejam as cavidades nasais - mas a bactéria também pode ser encontrada em outras partes do corpo como a garganta e o períneo. Porém, apenas uma pequena quantidade de pessoas corre o risco de um dia sofrer algum tipo de infecção por portar este tipo de bactéria em suas mucosas nasais (BROWN et al., 2014). A presença de *S. aureus* no interior das cavidades nasais afeta de 23% a 46% da população adulta e 64% das crianças (MARTIN; LINA; DUMITRESCU, 2014). Todavia, a alta quantidade de hospedeiros humanos facilita o acontecimento de *Intoxicações Alimentares Estafilocócicas* (IAE), que costumeiramente são atribuídas ao manuseio inadequado de alimentos em geral - tanto no preparo quanto no armazenamento, evidenciando a necessidade de práticas

adequadas de higiene durante toda a cadeia produtiva, bem como, atenção à *Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle* (APPCC) e *Boas práticas de Fabricação* (BPF) (KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014). A contaminação cruzada pode fazer com que um manipulador de alimentos que possua altas concentrações de *S. aureus* em suas mãos contamine o alimento e faça com que a bactéria se aloje no intestino do hospedeiro, encontrando condições ideais para desenvolvimento e causando a intoxicação estafilocócica. Devido à sua facilidade em se alastrar pelo ambiente e a forte presença na epiderme e mucosas humanas, a detecção de *S. aureus* é um forte indicador de higiene deficiente tanto na manipulação de alimentos, quanto no ambiente de processamento (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010).

Esta bactéria não necessita desenvolver-se para causar riscos à saúde, já que é capaz de sobreviver por longos períodos de tempo em ambientes com baixa umidade e consequentemente, contaminar feridas e alimentos. Todavia, quando em condições ideais e a pleno crescimento, produz uma série de fatores virulentos que podem causar danos tanto ao hospedeiro, quanto a micro-organismos concorrentes, dentre os quais podem ser mencionados: coagulases que coagulam o plasma e revestem a célula bacteriana prevenindo a fagocitose e dificultando o ataque por parte dos demais micro-organismos; Hialuronidases que atuam sobre o ácido hialurônico, facilitando a transmissão de componentes patogênicos em tecidos; Desoxirribonucleases (DNase), que agredem diretamente o DNA celular; Proteína A, composto produzido especificamente pelo *S. aureus* que se liga à imunoglobulina G (IgG) do hospedeiro, dificultando as defesas do organismo; Toxinas estafilocócicas que atuam como superantígenos capazes de estimular a linfócitos-T; Leucocidina Panton-Valentine (PVL) que torna indivíduos infectados mais suscetíveis a doenças, atuando na destruição do tecido pulmonar; adesinas; modulinas solúveis em fenol e polissacarídeos capsulares (TODD, 2014; LEUNG, 2014).

A presença de *S. aureus* em alimentos já foi observada em carnes e produtos cárneos, leite cru e pasteurizado, queijo, peixe, produtos industrializados e instantâneos. Baran, Erdogan e Adiguzel (2017) estudaram a incidência e a contaminação por *S. aureus* em queijos. Os autores partiram da hipótese que parte dos consumidores possui propensão a buscar queijos produzidos a partir de leite cru devido a maior intensidade de aromas e sabores. Também assumiram que o processamento do leite em queijo e posterior amadurecimento são capazes de eliminar ou reduzir drasticamente os níveis de micro-organismos nocivos. Todavia, o resultado do estudo mostrou que não é possível generalizar o comportamento de *S. aureus* em queijos, tanto nos casos de produção utilizando leite cru, como nos casos em que se submete o leite ao processo de pasteurização. Esta imprevisibilidade no comportamento do micro-organismo pode estar diretamente associada à alta resistência do *S. aureus* às mais diversas condições, o que inclui variações em parâmetros como temperatura, pH e atividade de água. Em geral, estima-se que quando a concentração de *S. aureus* é superior a  $10^5$  UFC/g durante a produção de queijo, ocorrerá produção de enterotoxinas estafilocócicas em quantidades suficientes para oferecer riscos de contaminação. Rola et al. (2015) conduziram experimentos onde 62% das amostras de leite cru analisadas apresentaram resultados positivos para o teste de coagulase-positiva em

níveis que variam entre  $1,0 \cdot 10^0$  e  $1,0 \cdot 10^5$  UFC/mL, o que expõe a necessidade de se entender os riscos relacionados ao consumo de queijo proveniente de leite não pasteurizado.

## 2.2 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS (SE)

Do ponto de vista da segurança alimentar, o gênero *Staphylococcus* representa uma grave ameaça à saúde e ao bem estar da população em geral. Com a capacidade de produzir uma vasta gama de fatores virulentos como antígenos patogênicos, proteínas de superfície, enzimas e outros compostos proteicos capazes de invadir ou burlar o sistema imunológico de animais em geral, a particularidade mais preocupante deste grupo de bactérias é a habilidade de confeccionar compostos tóxicos eméticos e não eméticos. Estes compostos são capazes de danificar desde membranas celulares, até desencadear Síndrome do Choque Tóxico em casos mais extremos (HU et al., 2018).

Atualmente sabe-se que o *S. aureus* é capaz de produzir 23 tipos diferentes de compostos proteicos, com composição variando de 168 a 261 aminoácidos na cadeia peptídica, e peso molecular de 26 a 29 kDa, denominados como sendo enterotoxinas estafilocócicas (SE) (HU et al., 2018). Estas toxinas são solúveis em água e consideradas como superantígenos - capazes de ativar uma grande quantidade de células T, causando alta liberação de citocinas, e caracterizam-se por formar ligações simultâneas com o Complexo Maior de Histocompatibilidade (CHM) de classe II, entre a célula que apresenta o antígeno e os receptores de células T. Com a formação destas ligações, percebe-se o início dos efeitos sistêmicos como vômito, diarreia, febre alta e disfunções hepáticas e renais (FERNÁNDEZ et al., 2006).

Seus genes podem ser conduzidos por plasmídeos (*seb*, *sed* e *sej*) (BAYLES; IANDOLO, 1989; ZHANG; IANDOLO; STEWART, 1998), fagos (*sea* e *see*) (BETLEY; MEKALANOS, 1985), ou por cromossomos (*seb*, *sec*, *seh*, *sei*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep* e *seq*) (FITZGERALD et al., 2001; JARRAUD et al., 2001; ORWIN et al., 2001; ORWIN et al., 2003; OMOE et al., 2002; OMOE et al., 2004; LETERTRE et al., 2003).

Destas, apenas cinco são classificadas como enterotoxinas estafilocócicas clássicas e capazes de serem facilmente detectadas através de testes comerciais, sendo caracterizadas como exoproteínas hidrossolúveis e pela presença de uma ponte de dissulfeto próxima ao centro da molécula. São identificadas pelas letras *A*, *B*, *C*, *D* e *E*, (*SEA* - *SEE*) e compostas por grandes quantidades de lisina, ácido glutâmico, aspártico, tirosina, dois resíduos de triptofano e cistina, que formam cisteína, composto este a que se atribuiu o sítio de toxicidade (BERGDOLL; ROBBINS, 1973; GRISPOLDI et al., 2019a). Além destas, existem também outras toxinas que já tiveram seus genes sequenciados, sendo nomeadas como enterotoxinas *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, *L*, *M*, *N*, *O*, *P*, *Q*, *R*, *S*, *T*, *U*, *V* e *X* (JARRAUD et al., 2001) (KURODA et al., 2001; ORWIN et al., 2001; LETERTRE et al., 2003; OMOE et al., 2003; THOMAS et al., 2006; WILSON et al., 2011).

Essas novas enterotoxinas são consideradas como membros da família das enterotoxinas

estafilocócicas, já que compartilham características filogenéticas, estruturais, funcionais e de homologia de sequência. Segundo o Comitê Internacional de Nomenclatura para Superantígenos de *Staphylococcus* (*International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigen Nomenclature* - INCSSN) recomenda-se que o termo enterotoxina seja utilizado somente para os superantígenos eméticos e que induzam a emese via administração oral em experiências conduzidas em primatas. Às demais toxinas, que não causam emese, designou-se a utilização do termo "enterotoxina estafilocócica semelhante a superantígeno" (*Staphylococcal Enterotoxin-like Superantigens* - SEI) (LEUNG, 2014; LINA et al., 2004). Portanto, as toxinas *SEJ*, *SEK*, ..., *SEU* devem ser denominadas como *SEIJ*, *SEIK*, ..., *SEIU*, com exceção das toxinas *SEIG*, *SEIH* e *SEII*, que já apresentaram atividade emética (OMOE et al., 2003; OMOE et al., 2005). Desta mesma forma, *SEF* atualmente não se encontra incluída na lista alfabética de Enterotoxinas Estafilocócicas, pois comprovou-se posteriormente à sua descoberta e nomenclatura, que a mesma não é capaz de produzir atividade emética.

As enterotoxinas clássicas são substâncias eméticas e termoestáveis, possuem alta resistência a condições físicas variáveis como baixo pH, congelamento e secagem, apresentam estabilidade em altas temperaturas e não são completamente desnaturadas durante o processo de pasteurização. Condições estas que a própria bactéria *S. aureus* não é capaz de suportar, o que torna estes compostos tóxicos, um risco de contaminação em potencial (GRISPOLDI et al., 2019b; TODD, 2014).

Os casos de intoxicação alimentar por *S. aureus* geralmente estão relacionados à enterotoxina estafilocócica tipo A (*SEA*). O gene *entA* é composto por 771 pares de base, e diferencia-se dos genes de *seb* e *sed* devido à sua interação de carregamento com bacteriófagos temperados. Assim como a *SED*, a *SEA* apresenta maior taxa de produção durante a fase exponencial e não é regulada pelo gene acessório *agr* (BORST; BETLEY, 1993). Possui 233 aminoácidos na cadeia, peso molecular de 27,1 kDa, e apresentou atividade emética com aplicação intraperitoneal de 0,3 µg em musaranhos. Os genes desta toxina são codificados através de profagos (HU et al., 2018). A enterotoxina estafilocócica A também possui a capacidade de permanecer ativa a 100 °C em caldo por até duas horas e a 121 °C por vinte e oito minutos em cogumelos (GRISPOLDI et al., 2019b).

A enterotoxina estafilocócica tipo B tem sua produção regulada pelo gene *entB* e apresenta cerca de 900 nucleotídeos. Sua estrutura consiste numa simples cadeia polipeptídica, formada por 239 aminoácidos, com peso molecular de 28,4 kDa, e constatou-se atividade emética ao administrar-se 10 µg de toxina em musaranhos. Esta toxina tem seus genes codificados nos cromossomos da célula bacteriana, na ilha de patogenicidade do *S. aureus* SaPI3 e no plasmídeo *pZA10* (JOHNS; KHAN, 1988; HU et al., 2018).

O grupo da enterotoxina estafilocócica C (*SEC*) é formado por três subtipos antigenicamente específicos, denominados *SEC1*, *SEC2* e *SEC3*, que apresentam grande reatividade imunológica entre si, e compartilham mais de 95% de similaridade de sequência, com *SEC3*

diferenciando-se de *SEC1* e *SEC2* por apenas 4 e 9 aminoácidos, respectivamente. Contudo, todos os três tipos possuem 239 aminoácidos na cadeia. O peso molecular da *SEC1* diferencia-se levemente das demais, com valor de 27,5 kDa, enquanto *SEC2* e *SEC3* pesam 27,6 kDa. Em geral, as enterotoxinas do grupo C têm seus genes codificados nas ilhas de patogenicidade do *S. aureus* e observou-se atividade emética de *SEC2* quando foram administradas doses de 1000 µg de toxina em musaranhos (COUCH; BETLEY, 1989; MARR et al., 1993; HU et al., 2018).

O gene *entD*, localizado no plasmídeo *PIB 485*, regula a produção da enterotoxina estafilocócica tipo D, o segundo tipo mais associado a casos de intoxicação alimentar. Esta enterotoxina possui 233 aminoácidos na cadeia peptídica e peso molecular de 26,9 kDa. Apesar de estar relacionada a surtos de contaminação alimentar, a quantidade necessária de toxina para causar atividade emética em musaranhos é de 40 µg por animal, valor mais de cem vezes superior em relação à SEA (BAYLES; IANDOLO, 1989; HU et al., 2018).

A enterotoxina estafilocócica tipo E é regulada pelo gene *entE* que, em teoria, é codificado no profago da célula. A *SEE* apresenta homologia de 81% com SEA e apresenta 230 aminoácidos na cadeia peptídica, com peso molecular de 26,4 kDa. Apresenta atividade emética com doses de 10 µg de toxina administradas intraperitonealmente em musaranhos (BUSSCHE; LYON; BOHACH, 1993) (HU et al., 2018).

A caracterização do gene *entG*, que regula a produção da enterotoxina estafilocócica tipo G foi realizada por Betley, Borst e Regassa (1992). É formada por 233 aminoácidos e apresenta peso molecular de 27 kDa. Possui similaridade com *SEB* (39,1%) e *SEC* (37,8%), apesar de estar mais relacionada ao super antígeno estreptocócico A (SSA) e com a enterotoxina pirogênica A de *Streptococcus* (SPEA), com 41,6% e 40,3% de similaridade, respectivamente. Foi constatado que 200 µg administrados intraperitonealmente em musaranhos foram capazes de causar atividade emética nos animais. O gene *entG* é codificado em *egc1*, *egc2*, *egc3* e *egc4*. Os genes para as toxinas G, I, M, N e O pertencem ao mesmo *cluster* de codificação *egc* e, portanto, a detecção de um desses genes pode, normalmente, indicar a presença dos outros quatro. (HU et al., 2018; MEMPEL et al., 2003; MUNSON et al., 1998).

Ren et al. (1994) sequenciaram o gene da enterotoxina tipo H (*SEH*), que apresenta 36-38% de correspondência em relação aos outros tipos de toxina. Os anticorpos responsáveis pela inativação da enterotoxina tipo H são específicos e totalmente diferentes dos responsáveis por inativar as toxinas A, B, C, D e E (SU; WONG, 1995). A *SEH* possui 217 aminoácidos na cadeia e seu peso molecular é de 25,1 kDa. Foi possível observar atividade emética desta toxina quando foram administradas doses de 1000 µg em musaranhos. Seus genes são codificados no transposon *MGE<sub>mw2</sub>/mssa476* e *seh/Δseo* (HU et al., 2018).

A menor homologia de sequência em relação a outros tipos pode ser observada na enterotoxina tipo I (*SEI*), que é codificada pelo gene *entI*, exibindo 218 nucleotídeos e peso molecular de 24,9 kDa. Após a administração de apenas 1 µg desta toxina em musaranhos, já foi possível constatar atividade emética. Juntamente com *SEG*, é capaz de causar além de resposta

emética, grande proliferação de células T, com produção de interleucina II e Interferon gama. Devido à sua similaridade com outras toxinas, a *SEI* costuma ser agrupada com *SEL*, *SEK*, *SEM* e *SEQ* (HU et al., 2018; MUNSON et al., 1998; ORWIN et al., 2003). A Tabela 1 sumariza as informações sobre os diferentes grupos de enterotoxinas.

Todos os superantígenos de *staphylococcus* (*SA*) - o que inclui as enterotoxinas estafilocócicas (*SE*), são codificados em elementos genéticos móveis, o que inclui plasmídeos, profagos, ilhas de patogenicidade do *S. aureus* (*SaPIs*), ilhas genômicas, *vSa* e o cassete cromossômico estafilocócico (*SCC*). A maioria das enterotoxinas conhecidas estão localizadas na ilha de patogenicidade do *S. aureus* (*SaPI*). O genoma de algumas cepas do *S. aureus* geralmente contém uma ou mais *SaPIs*, apesar de que algumas destas cepas sequer apresentam fator de virulência. As *SaPIs* estão inseridas em uma única orientação dentro de localidades específicas do cromossomo. A maioria destas ilhas de patogenicidade foram previamente identificadas em cepas clínicas do *S. aureus* (*SaPI1*, *SaPI2*, *SaPI3*, *SaPI4*, *SaPI5*, *SaPI<sub>in1/m1</sub>* e *SaPI<sub>mw2</sub>*), enquanto outras foram isoladas a partir de um caso de mastite bovina. Estima-se que a indução de uma *SaPI* aumente a quantidade de cópias dos genes produtores de toxinas e, conseqüentemente, a quantidade de toxinas produzidas (SUMBY; WALDOR, 2003; NOVICK; CHRISTIE; PENADÉS, 2010; HU et al., 2018).

## 2.3 HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO ALIMENTAR NO BRASIL

No Brasil, os casos de infecção estafilocócica não são de notificação compulsória ao Ministério da Saúde e, portanto, não existe um sistema efetivo de controle da atuação deste micro-organismo funcionando no país. Sendo assim, dificulta-se a mensuração do desenvolvimento de *S. aureus*, bem como da produção de suas enterotoxinas em casos de infecção em ferimentos e similares. Todavia, os surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos - DTA - que englobam os casos de intoxicação estafilocócica, são registrados regularmente desde o ano 1999, e compulsoriamente desde o ano de 2017 (BRASIL. Ministério da Saúde, 2018).

Segundo o Ministério da Saúde, entende-se por Doença Transmitida por Alimentos como sendo síndrome constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre, relacionada à ingestão de alimentos ou água contaminados, podendo abranger tanto infecções como intoxicações alimentares. Além disso, estas síndromes podem ser causadas por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príons, agrotóxicos, substâncias químicas e metais pesados; com o quadro clínico variando desde desconfortos intestinais leves, até quadros extremamente sérios com desidratações graves, diarreia sanguinolenta e insuficiência renal aguda (BRASIL. Ministério da Saúde, 2018).

Define-se como surto, um episódio em que duas ou mais pessoas apresentam os mesmos sinais/sintomas após a ingestão de alimento e/ou água proveniente da mesma fonte. Todos os surtos de DTA constituem, compulsoriamente, um Evento de Saúde Pública (ESP), que necessita

Tabela 1 – Características biológicas de Enterotoxinas Estafilocócicas e Enterotoxinas Estafilocócicas semelhantes a superantígeno.

SEs e SEIs	Comprimento (aa)	Peso Molecular (kDa)	Atividade Superantigênica	Atividade Emética <sup>a</sup>		Elementos Genéticos
				Macacos <sup>b</sup>	Musaranho Doméstico <sup>c</sup>	
SEA	233	21,1	+	5 (ED <sub>50</sub> )	0,3	Profago
SEB	239	28,4	+	5 (ED <sub>50</sub> )	10	Cromossomo, SAPI3, plasmídeo
SEC1	239	27,5	+	5 (ED <sub>50</sub> )	NE <sup>d</sup>	SaPI
SEC2	239	27,6	+	5 (ED <sub>50</sub> )	1.000	SaPI
SEC3	239	27,6	+	5 (ED <sub>50</sub> )	NE	SaPI
SED	233	26,9	+	5 (ED <sub>50</sub> )	40	Plasmídeo (pIB485)
SEE	230	26,4	+	10-20(ED <sub>50</sub> )	10	Profago (hipotético)
SEG	233	27,0	+	160-320	200	egc1, egc2, egc3, egc4 Transposon
SEH	217	25,1	+	30	1.000	(MGE <sub>mw2</sub> /mssa476 seh/ $\Delta$ seo)
SEI	218	24,9	+	300-600	1	egc1, egc2, egc3
SEIJ	245	28,6	+	NE	NE	Plasmídeo (pIB485, pF5)
SEK	219	25,3	+	100(2/6)	NE	Profagos, SaPI1, SaPI3, SaPI5, SaPI <sub>bov1</sub>
SEL	216	24,7	+	100(1/6)	NE	SaPI <sub>in1</sub> , SaPI <sub>im1</sub> , SaPI <sub>mw2</sub> , SaPI <sub>bov1</sub>
SEM	217	24,8	+	100(1/7)	NE	egc1, egc2
SEN	227	26,1	+	100(1/8)	NE	egc1, egc2, egc3, egc4
SEO	232	26,8	+	100(2/6)	NE	egc1, egc2, egc3, egc4, Transposon
SEP	233	26,7	+	100(3/6)	50	Profago (Sa3n)
SEQ	216	25,2	+	100(2/6)	NE	SaPI1, SaPI3, SaPI5, Prophage
SER	233	27,0	+	<100	<1.000	Plasmídeo (pIB485, pF5)
SES	257	26,2	+	<100	20	Plasmídeo (pF5)
SET	216	22,6	+	<100	1.000	Plasmídeo (pF5)
SE1U	261	27,2	+	NE	NE	egc2, egc3
SE1V	239	27,6	+	NE	NE	egc4
SE1W	256	26,7	+	NE	NE	egc4
SE1X	168	19,3	+	NE	NE	Cromossomo
SE1Y	221	22,5	+/-	NE	500	Cromossomo

+Reação positiva

<sup>a</sup> $\mu$ g/animal<sup>b</sup>Administração via oral<sup>c</sup>Administração intraperitoneal<sup>d</sup>Não examinado

Fonte: Adaptado de HU et al., 2018.



ter sua notificação compulsória realizada imediatamente, e registro no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), em até sete dias (BRASIL. Ministério da Saúde, 2018).

Após a detecção de um surto de DTA/ESP, a legislação exige que equipe técnica da Vigilância Epidemiológica - VE avalie os dados disponíveis nos documentos da notificação compulsória no Sinan, a fim de determinar as possíveis fontes de origem da contaminação. Após esta avaliação, são realizadas investigações locais, com coleta de amostras, para posterior análise no Laboratório Central de Saúde Pública - LACEN, com o intuito de identificar o agente causador da enfermidade. Após o diagnóstico, são recomendadas medidas de prevenção e controle e procede-se com o encerramento do caso de surto registrado no Sinan, com produção de informes e boletins acerca do acontecimento (BRASIL. Ministério da Saúde, 2018).

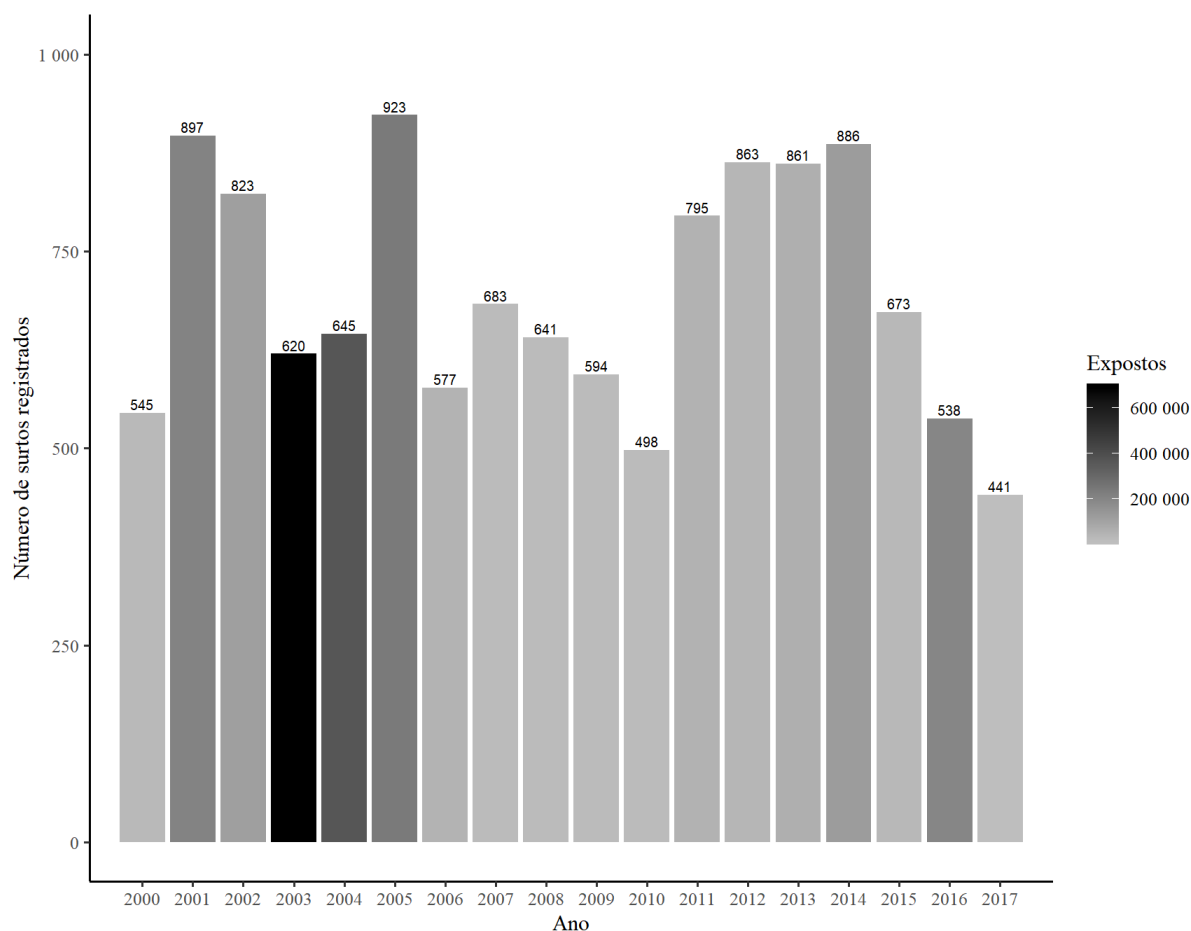
Tabela 2 – Série histórica de surtos de DTA. Brasil, 2000 a 2017.

Ano de Notificação	Surtos	Expostos	Doentes	Óbitos	Taxa de letalidade
2000	545	31.943	9.613	4	0,04%
2001	897	211.228	15.706	5	0,03%
2002	823	116.962	12.402	5	0,04%
2003	620	688.742	17.981	4	0,02%
2004	645	368.167	21.781	21	0,10%
2005	923	242.191	17.279	12	0,07%
2006	577	49.044	10.356	8	0,08%
2007	683	25.195	11.635	11	0,09%
2008	641	23.275	8.736	26	0,30%
2009	594	24.014	9.407	12	0,13%
2010	498	23.954	8.628	11	0,13%
2011	795	52.640	17.455	4	0,02%
2012	863	42.138	14.670	10	0,07%
2013	861	64.340	17.455	8	0,05%
2014	886	124.359	15.700	9	0,06%
2015	673	35.826	10.676	17	0,16%
2016	538	200.896	9.935	7	0,07%
2017	441	15.287	6.559	8	0,12%
<b>Total Geral</b>	<b>12.503</b>	<b>2.340.201</b>	<b>236</b>	<b>182</b>	<b>0,08%</b>

Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde, 2018.

A Tabela 2 mostra dados referentes ao controle de DTAs ao longo do período compreendido entre os anos de 2000 e 2017. Em uma análise superficial através da Figura 1, é possível perceber que a quantidade de surtos ocorridos não segue um padrão bem definido de comportamento, evidenciando que políticas de controle e prevenção de Doenças Transmitidas por Alimentos não foram eficientes ou simplesmente não foram adequadamente implementadas no Brasil durante este período. Também é possível perceber que a quantidade de surtos ocorridos em determinado ano não é proporcional ao número de indivíduos expostos, tornando este índice insuficiente para determinar o risco à saúde da população.

Figura 1 – Número de surtos de DTA por ano e intensidade de indivíduos expostos durante o mesmo período.



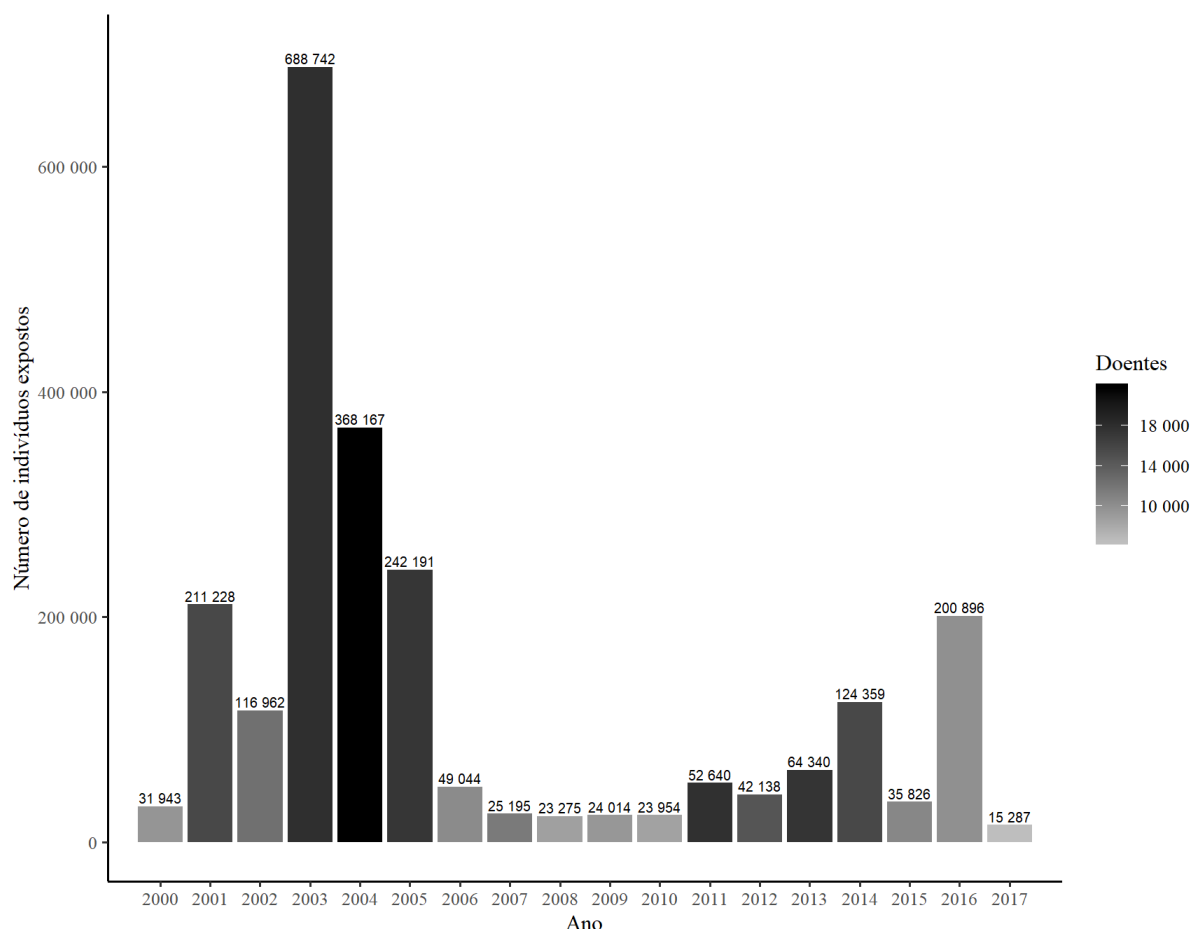
Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde, 2018.

A Figura 2 relaciona a quantidade de indivíduos expostos ao longo do mesmo período de tempo, com a quantidade de pessoas que apresentaram adoecimento após o consumo de alimentos contaminados. É possível perceber que nos anos de 2003 e 2004, o número de surtos foi menor do que em anos anteriores. Entretanto, a quantidade de indivíduos expostos e os registros de adoecimento por DTAs foi maior do que em qualquer outro período.

Segundo os dados apresentados, constata-se que entre 2014 e 2017, houve uma considerável diminuição no número de surtos registrados, ao passo que a quantidade de indivíduos contaminados não se estabiliza. De qualquer forma, o número de registros de adoecimento diminuiu consideravelmente neste período, tornando muito difícil estabelecer uma relação entre o número de surtos, quantidade de indivíduos expostos e quantidade de indivíduos doentes.

Ainda segundo dados do Ministério da Saúde, dos 12.503 surtos notificados entre os anos de 2000 e 2017, 3.196 foram confirmados laboratorialmente, sendo que deste total, 2.593 possibilitaram a identificação dos agentes etiológicos envolvidos, sendo 92,2% dos casos causa-

Figura 2 – Número de indivíduos expostos a DTAs por ano e intensidade de casos de adoecimento durante o mesmo período.

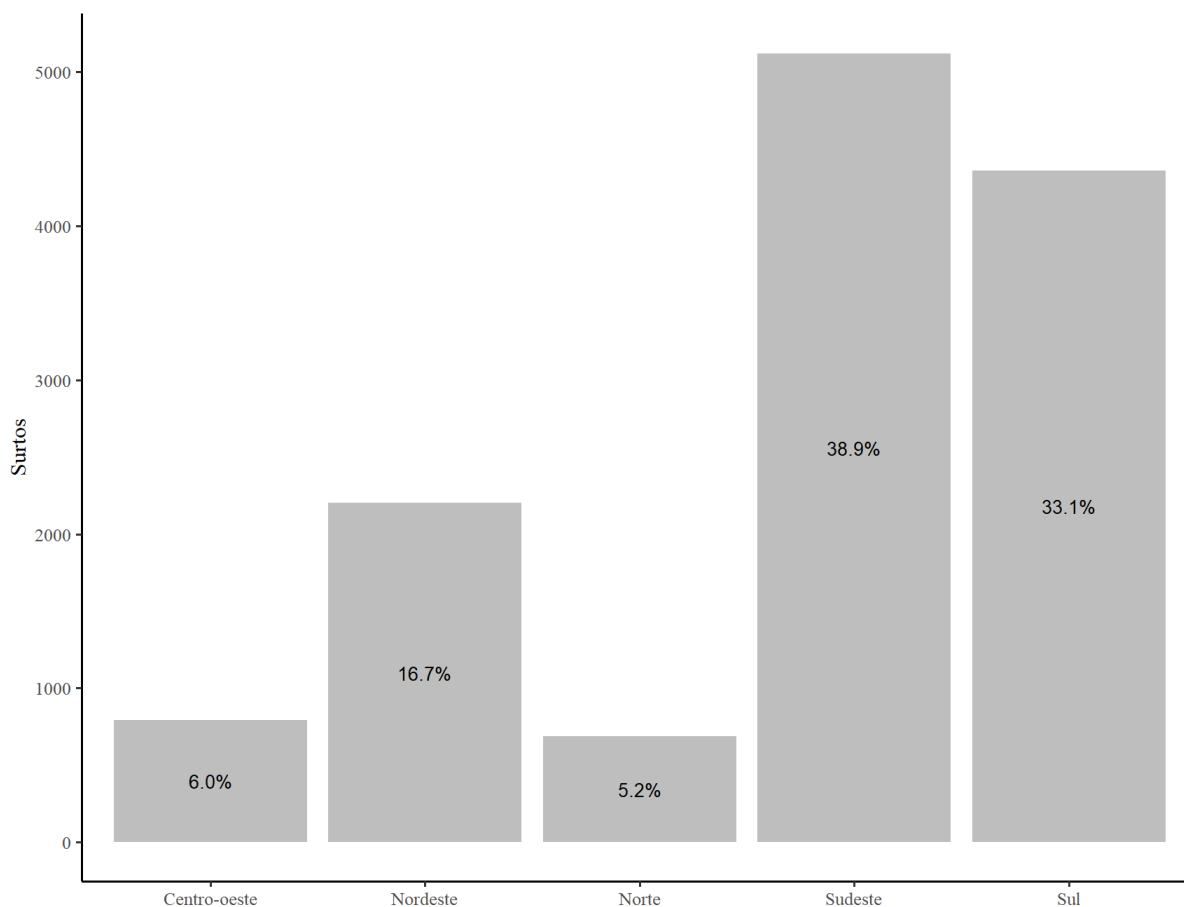


Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde, 2018.

dos por bactérias, 6,0% por vírus, 1,2% por agentes químicos/outras e 0,6% por protozoários e helmintos. Apesar dos surtos de DTA englobarem problemas de infecções alimentares causados por vários vetores de contaminação diferentes, verifica-se que a grande maioria dos casos ainda têm micro-organismos - mais especificamente bactérias, como fonte causadora.

Os dados disponibilizados também permitem verificar as regiões do Brasil com maior índice de surtos ocorridos entre os anos de 2000 e 2018 (Figura 3). As regiões Sul e Sudeste, apresentam registros de surtos de DTA maiores do que as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste somadas. Não há informações oficiais que justifiquem a grande discrepância na quantidade de surtos ocorridos entre as regiões do país. Todavia, ao observar que na grande maioria das vezes, o surto ocorreu em residências domésticas, é possível estimar que a população brasileira - ao longo deste período, ainda não se atenta à necessidade de garantir o armazenamento apropriado do alimento, bem como ao risco de contaminação através de vetores diversos como exposição do alimento ao ambiente, manipulação inadequada, contaminação cruzada por utensílios ou superfícies e similares.

Figura 3 – Número de surtos de DTA's por região.



Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde, 2018.

As regiões Sudeste e Sul foram as que apresentaram maior número de casos de DTA entre os anos de 2000 e 2018, representando 38,9% e 33,1% do total de casos, respectivamente (Figura 3). Já a região Norte apresentou o menor índice de acontecimentos de DTA no mesmo período, com apenas 5,2% do total de casos. Não é possível afirmar com base nos dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde se a discrepância no número de surtos entre as regiões é devida somente a características regionais, ou se a diferença acontece devido a condições de controle destes surtos, ou ainda, se todos os casos envolvendo surtos de DTA foram registrados, sendo que pode ocorrer uma maior notificação nas regiões Sudeste e Sul em relação às demais.

A Tabela 3 mostra os dez maiores agentes primários causadores de surtos de DTA, por região. Os agentes causadores mais recorrentes são a *Salmonella spp* (1538), *Staphylococcus aureus* (900), *Escherichia coli* (747), *Bacillus cereus* (370) e *Rotavírus* (246). Apesar do número expressivo de ocorrências, a maior parte dos surtos ocorridos no Brasil entre os anos de 2000 e 2018, não teve seu agente causador devidamente identificado, sendo que do total de 13.163 surtos registrados, 7.262 (55%) casos tiveram suas causas ignoradas, enquanto 506 (3,8%) apresentaram

Tabela 3 – Agentes mais comumente envolvidos em surtos de DTAs no Brasil, no período de 2000 a 2017.

Agente	Centro-Oeste	Nordeste	Norte	Sudeste	Sul	Total
<i>Bacillus Cereus</i>	12	105	18	52	183	370
<i>Clostridium perfringens</i>	12	51	4	56	101	224
<i>Escherichia coli</i>	39	259	27	209	213	747
Ignorado	552	1.041	474	3.219	1.976	7.262
Inconclusivo	5	167	17	213	104	506
Rotavírus	4	41	5	192	4	246
<i>Salmonella Enteritidis</i>	4	4	-	81	42	131
<i>Salmonella</i> spp	57	102	28	188	1.163	1.538
<i>Staphylococcus aureus</i>	32	178	56	260	374	900
Vírus da Hepatite A	2	28	1	174	2	207

Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde, 2019.

resultados inconclusivos. Pode-se considerar também os 127 (0,9%) casos categorizados como "inconsistentes" no resultado, acarretando num total de 7.895 (60%) de surtos alimentares sem causa plenamente definida (BRASIL. Ministério da Saúde, 2018).

Todavia, devem ser consideradas as dificuldades inerentes do processo de identificação microbiológica, uma vez que o procedimento de notificação compulsória só tornou-se obrigatório no Brasil a partir do ano de 2017 (BRASIL. Ministério da Saúde, 2017), quando passou-se a considerar surtos de DTA como sendo Eventos de Saúde Pública. Além disso, o procedimento padrão versa que a notificação pode ocorrer no prazo máximo de 24 horas, o que pode comprometer as evidências de contaminação - como alimentos e superfícies em geral, caso notifique-se o surto após com algum período de dilação, dificultando a coleta de amostras e posterior diagnóstico.

A Figura 4 mostra a evolução do procedimento de registro de DTAs ao longo do período compreendido entre os anos de 2000 e 2018. É possível perceber a grande discrepância entre os dados, principalmente no intervalo de 2000 e 2006, quando a região Sudeste registrou a menor quantidade de surtos desde que o procedimento de notificação passou a ser adotado, em 1999; ficando somente à frente da região Norte que no mesmo período listou somente 4 casos de surtos. No entanto, o padrão não se repetiu nos demais anos. Já a região Sul, demonstra um padrão decrescente na quantidade de surtos registrados desde o ano de 2005, apresentando a menor quantidade de surtos no ano de 2010. A análise destas curvas não permite que se estabeleça um padrão de comportamento para cada região, já que se desconhecem os fatores externos que contribuem para o acontecimento de surtos de DTA ao longo do território brasileiro. Além disso, pode-se conjecturar a ocorrência de surtos ao longo do período que sequer foram registrados, devido à falta de obrigatoriedade da notificação.

Figura 4 – Evolução do procedimento de registros de surtos de DTA's por região.



Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde, 2019.

## 2.4 INTOXICAÇÃO POR *STAPHYLOCOCCUS*

De 2000 a 2018, foram registrados 900 surtos envolvendo o *S. aureus* como agente primário de contaminação, com a região Sul apresentando o maior número de casos (374), seguida da região Sudeste (260), Nordeste (178), Norte (56) e Centro-Oeste (32). Dentre eles, o estado que mais registrou surtos foi o Rio Grande do Sul, com 161 casos, seguido do Paraná (140), Rio de Janeiro (99), Santa Catarina (73), Minas Gerais (71), São Paulo (65) e Espírito Santo (15). O estado de Pernambuco também se destaca na quantidade de casos registrados durante o mesmo período, com 116 ocorrências.

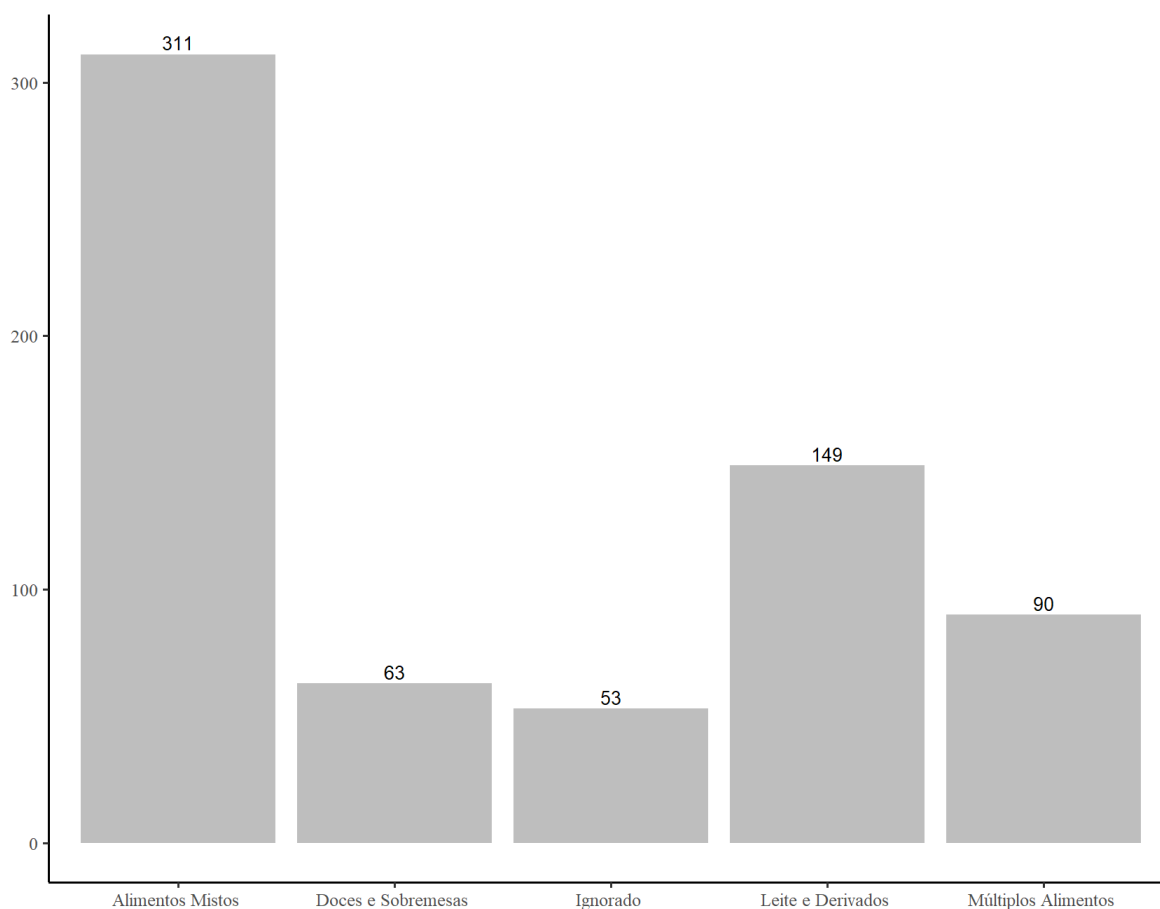
Apesar de geralmente estar associado a infecções e intoxicações alimentares; e infecções de pele, o *S. aureus* também oferece risco de bacteremia caso contamine a corrente sanguínea do hospedeiro, oferecendo uma taxa de letalidade compreendida entre 15%-25%. As causas que podem estar relacionadas com o acontecimento de bacteremia por *S. aureus* não são claramente definidas, mas por não ter relação com contaminação alimentar, não entram nos registros nacionais do Sinan (HU et al., 2018).

Para entender os fenômenos envolvidos no acontecimento de surtos envolvendo o *S. aureus* no Brasil, é necessário avaliar os tipos de vetores de contaminação mais comuns - neste caso, alimentos. Ao realizar o registro do surto no Sinan, o agente de saúde responsável deve informar a fonte causadora da contaminação, selecionando-a dentre uma lista de 20 categorias disponíveis, sendo estas: Água; Alimentos mistos; Bebidas não alcoólicas; Carne bovina *in natura*, processados e miúdos; Carne de ave *in natura*, processados e miúdos; Carne suína *in natura*, processados e miúdos; Cereais, farináceos e produtos à base de cereais; Doces e sobremesas; Especiarias, temperos secos, condimentos, molhos industrializados e similares; Frutas, produtos de frutas e similares; Gelados comestíveis; Hortaliças; Ignorado; Inconclusivo; Inconsistente; Leite e derivados; Múltiplos alimentos; Ovos e produtos à base de ovos; Pescados, frutos do mar e processados; Produtos cárneos embutidos, obtidos de emulsão de carnes bovina, suína e de aves, adicionados de ingredientes (BRASIL. Ministério da Saúde, 2017).

A Figura 5 apresenta os cinco alimentos mais comumente envolvidos em casos de contaminação estafilocócica. A elevada quantidade de casos relacionados a surtos envolvendo leites e derivados é coerente com o comportamento do *S. aureus* e produção de enterotoxinas encontrado na literatura (VALIHRACH; ALIBAYOV; DEMNEROVA, 2013). Todavia, não é possível avaliar as categorias "Alimentos mistos" e "Múltiplos alimentos" de maneira mais aprofundada, uma vez que não são citadas subcategorias que ofereçam maiores informações nutricionais sobre a composição dos alimentos envolvidos nestes surtos (carnes, massas, etc.).

Entende-se por alimentos mistos como aqueles que possuem em sua composição grupos diferentes de ingredientes (ex: pizza, carne ao molho), e sua relação com o elevado número de ocorrências também é percebida em países da Europa (EFSA; ECDC, 2015). Já a categoria "Múltiplos alimentos" é utilizada quando o surto alimentar apresenta dois ou mais alimentos

Figura 5 – Alimentos mais comuns envolvidos em casos de contaminação estafilocócica no Brasil.



Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde, 2019.

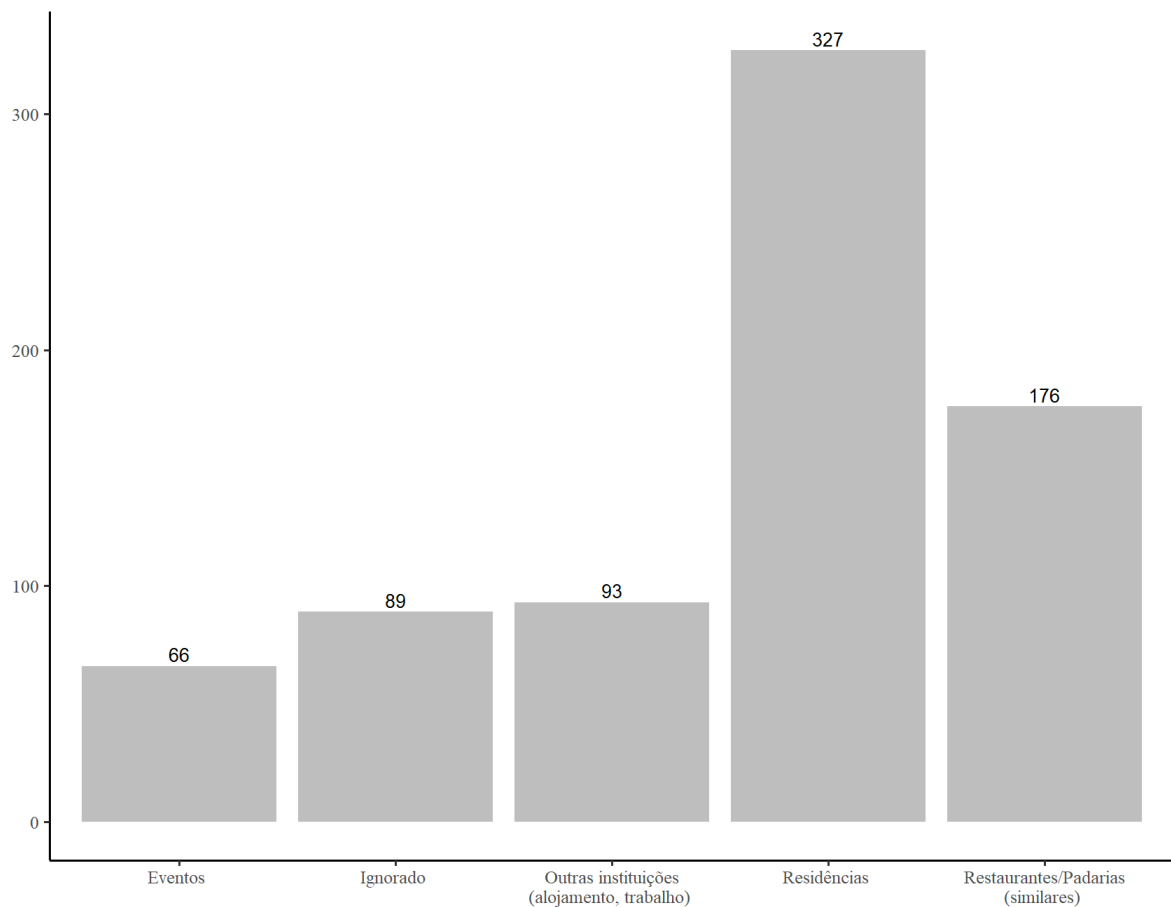
como fonte de contaminação. Finalmente, a categoria "Ignorado" engloba as situações em que não houve registro de alimentos relacionados ao surto no momento da notificação, sendo categoria totalmente diferente de "inconclusivo- quando não é possível determinar o alimento responsável pelo surto; e "inconsistente- quando o registro não corresponde a alimentos.

Também é possível avaliar onde ocorreram os surtos de contaminação estafilocócica, a fim de determinar parâmetros que possam ter exercido influência sobre a contaminação do alimento, e, conseqüentemente, a contaminação do hospedeiro. A Figura 6 elenca os cinco locais com maior número de ocorrências de surtos envolvendo *S. aureus* no Brasil, entre os anos de 2000 e 2018. Percebe-se que, na grande maioria dos casos, os surtos originaram-se em residências domésticas, o que pode ter ligação direta com variáveis como exposição do alimento a temperaturas inadequadas durante o armazenamento ou preparo, utensílios indevidamente higienizados atuando como vetores de contaminação cruzada, higiene insuficiente por parte do manipulador de alimentos, ou até mesmo falta de cuidado no manejo do produto. É possível estimar que o número de surtos em residências poderia ser menor caso a população tivesse maior



ciência sobre os riscos de contaminação relacionados a alimentos.

Figura 6 – Locais mais comuns envolvidos em casos de contaminação estafilocócica no Brasil.



Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde, 2019.

O fato que grande número de surtos também pode ser observado em locais que devem, devido à legislação legal, manter condições ideais para preparo, manejo e armazenamento de alimentos, é, no mínimo, preocupante. O *caput* da Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004 (BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2004), que apresenta o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação, versa que tantos os equipamentos, como os utensílios e as instalações devem ser mantidos em condições higiênico-sanitárias apropriadas a fim de minimizar o risco de contaminações em alimentos. Nela também é especificada a necessidade de separação entre alimentos beneficiados e crus, e a importância de realizar a antissepsia das mãos antes de se manusear alimentos. Mesmo assim, foram contabilizados 331 surtos por *S. aureus* entre 2000 e 2018, o que corresponde a quase 37% do total de casos registrados.

O *S. aureus* também é considerado como fator de risco pelos sistemas de controle de contaminações alimentares de outros países. Nos EUA, este controle fica a cargo do CDC - Center

for Disease Control and Prevention, ligado ao Departamento de Saúde e Serviços Humanos Americano (*U.S. Department of Health & Human Services*). Além de realizar o monitoramento de surtos ocorridos através de contaminação alimentar, o CDC também classifica os registros em fatores de contaminação, proliferação e amplificação; bem como categoriza as ocorrências etiologias confirmadas - causa do fenômeno é atestado com evidências científicas; e suspeitas - quando não há evidências científicas para comprovar a ação do agente de contaminação; dando ênfase também a surtos relacionados à enterotoxina estafilocócica.

De 2009 a 2015, o CDC registrou 75 casos de contaminação alimentar envolvendo a bactéria *Staphylococcus aureus* em território americano, com 1681 indivíduos expostos, 69 hospitalizações e nenhum óbito. Já em 2016 e 2017, o número de surtos mais que duplicou, chegando a 220 casos registrados (LIU, 2015; CASTRO; SILVA; TEIXEIRA, 2018; DEWEY-MATTIA et al., 2018).

No que diz respeito à enterotoxina estafilocócica, o CDC mantém números de ocorrências registradas desde 2011 até 2016 (Tabela 4). Neste período, observou-se o acontecimento de 68 surtos causados por enterotoxinas, com 1619 indivíduos expostos e 107 hospitalizações. Não foram observados óbitos durante o período. Apesar de ser um número baixo de ocorrências, é possível observar que a ação das enterotoxinas estafilocócicas tem potencial para afetar tantos indivíduos quanto infecções causadas pela bactéria *S. aureus* (BENNETT et al., 2012; BENNETT et al., 2013; DEWEY-MATTIA et al., 2014; DEWEY-MATTIA; MANIKONDA; VIEIRA, 2015; DEWEY-MATTIA et al., 2016; DEWEY-MATTIA et al., 2017).

Tabela 4 – Registro de contaminações por SA e SE nos Estados Unidos, entre 2011 à 2016.

Ano	Surtos				Expostos				Hospitalizações			
	CE	SE	Total	%	CE	SE	Total	%	CE	SE	Total	%
2011	3	6	9	2	20	93	113	1	3	11	14	2
2012	2	3	5	1	26	123	149	1	1	3	4	1
2013	6	4	10	2	221	42	263	2	25	2	27	3
2014	9	8	17	3	504	62	566	5	9	1	10	1
2015	5	8	13	2	236	55	291	2	31	0	31	3
2016	4	10	14	2	173	64	237	2	17	4	21	2
Total	29	39	68	-	1.180	439	1.619	-	86	21	107	-

<sup>1</sup>CE - Etiologia confirmada

<sup>2</sup>SE - Suspeita de etiologia

Fonte: (DEWEY-MATTIA et al., 2018)

De maneira geral, o diagnóstico de intoxicação por *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcal Food Poisoning* - SFP), acontece ao se detectar presença de enterotoxinas em concentrações maiores do que  $10^6$  UFC/g, em alimentos consumidos pelos pacientes infectados. Todavia, circunstâncias diversas também podem auxiliar no diagnóstico, como a detecção de enterotoxinas e grandes quantidade de *S. aureus* em vômito ou fezes de pacientes (CASTRO; SILVA;

TEIXEIRA, 2018).

Apesar da produção de enterotoxinas acontecer somente através de cepas específicas de *S. aureus*, é possível que ao analisar o alimento fonte da contaminação constata-se somente a presença de enterotoxinas, mas não de micro-organismos. Isso acontece devido à alta sensibilidade do *S. aureus* a fatores como tratamentos térmicos, congelamento, secagem e mudanças de acidez, que facilmente inativam a bactéria. Estes fatores raramente afetam a estrutura da enterotoxina. Dessa forma, o diagnóstico é baseado principalmente na presença de SE em alimentos (CASTRO; SILVA; TEIXEIRA, 2018; EFSA, 2009).

Em alguns casos, o surto de contaminação alimentar tem origem muito além do alimento, com fatores influenciando na contaminação e desenvolvimento do micro-organismo e etapas posteriores à produção, diretamente ligadas à matéria-prima e beneficiamento. Fetsch et al. (2014), avaliaram um surto de intoxicação estafilocócica associado ao consumo de sorvete contaminado. Após determinar a cepa relacionada ao surto e constatar que nenhum dos funcionários da empresa era portador da mesma, os autores chegaram à conclusão de que a contaminação partia diretamente do equipamento utilizado para produção, que devido a procedimentos de higiene não suficientes, terminava por infectar a matéria prima durante o beneficiamento.

Todd (2014) afirma que a grande maioria dos surtos envolvendo *S. aureus* acontece por erros cometidos pelos manipuladores de alimentos, que acabam contaminando o produto e permitindo o desenvolvimento da bactéria e da enterotoxina. Para o autor, os motivos mais comuns são: contato direto do alimento com manipuladores com mãos e braços com algum tipo de lesão causada por *S. aureus*; tosse e espirros, contaminação cruzada ao entrar em contato com o alimento após tocar barba e cabelo; contato com animais domésticos; contato com equipamento e superfícies contaminados; contato do alimento com feridas nas mãos, mucosas nasais e unhas.

## 2.5 DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

A detecção do *S. aureus* pode ser realizada por métodos diferentes que apresentam eficiência variada de acordo com a situação. A necessidade de se obter testes de detecção fáceis e com baixo custo, fez com que surgissem no mercado métodos alternativos para a detecção desta bactéria visando agilizar os procedimentos envolvidos em surtos alimentares para a detecção de novas cepas do micro-organismo e outras rotinas laboratoriais. Entretanto, estes novos métodos apresentam disparidades acerca de sua efetividade, custo e usabilidade, o que torna a escolha técnica envolvida no procedimento totalmente dependente dos fatores específicos envolvidos (COUTO et al., 2001; ONO et al., 2018).

A utilização de técnicas moleculares para a detecção de micro-organismos é bastante comum devido à sua alta taxa de especificidade. No caso do *S. aureus*, certas cepas que não são identificadas com clareza através de testes de fenótipos, geralmente fornecem resultados mais claros em testes de genótipo (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012). De qualquer forma, os

procedimentos para identificação e caracterização deste micro-organismo podem ser realizados de três formas diferentes: testes de fenótipo - que envolvem métodos baseados no meio de cultura, sistemas automatizados e análise de matrizes através de ionização; genótipo - que engloba os testes de reação em cadeia de polimerase, *microarray* e de sequenciamento; e epidemiológicos - que compreendem métodos de sequenciamento genético e análise cromossômica. Os testes de fenótipo tradicionalmente envolvem o isolamento do micro-organismo e análise fenotípica, através de testes como *Baird-Parker* (BP). Desenvolvido por Baird-Parker em 1962 e aperfeiçoado em 1965, este exame envolve o uso de cloreto de lítio, telurito de potássio e gema de ovo. A presença de sal e telurito de potássio seleciona os genes de *Staphylococcus*, formando colônias de cor escura facilmente detectáveis a olho nu, diferenciando-se pela formação de um halo duplo resultante da produção de lipase e lecitinase pelas cepas estafilocócicas coagulase-positivas, que decompõem lipídios e lecitina na gema do ovo (BAIRD-PARKER, 1962; BAIRD-PARKER; DAVENPORT, 1965).

A tipagem molecular através de métodos genotípicos possibilita obter maior especificidade e resultados mais sensíveis, principalmente quando aliada a análises de fenótipo, apresentando menores custos e maior rapidez, com processos de identificação apresentando resultados, em alguns casos, em até uma hora. Acaba tornando-se de extrema importância em casos de surtos alimentares por adicionarem camada adicional de resultados aos testes de *S. aureus*, possibilitando até mesmo, em alguns casos, a obtenção de padrões de transmissão de uma ou mais cepas envolvidas em casos de DTA (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012). A análise via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permite a detecção de micro-organismos que não oferecem a possibilidade de serem submetidos a meio de cultura devido a crescimento lento ou comportamento errático. Ao ser aplicado em *S. aureus*, a identificação via PCR busca encontrar os genes que codificam subunidades ribossômicas (rRNA), essenciais nos processos de classificação taxonômica de micro-organismos (CUNHA, 2018).

Os métodos de genotipagem epidemiológica têm como principal objetivo facilitar a investigação do *S. aureus* em casos de surtos alimentares com possibilidade de confirmação e caracterização dos padrões envolvidos na transmissão de uma ou mais cepas do micro-organismo, oferecendo informações suficientes para definir hipóteses sobre vetores de contaminação. No entanto, a aplicação de técnicas de genótipo em estudos epidemiológicos oferece algumas limitações, pois a validação destas só ocorre após a comprovação de sua capacidade de discriminar diferentes cepas envolvidas na ocorrência. Em um processo de Análise de Sequência de Multicocus (MLSA), analisam-se as sequências de nucleotídeos de vários genes *housekeeping* de expressão constante, pois estes apresentam maior conservação devido à sua participação na manutenção de funções celulares básicas em qualquer organismo. As sequências são comparadas por similaridade e, por isso a técnica de MLSA é totalmente adequada para separação de espécies microbianas (ALMEIDA et al., 2010).

A detecção de enterotoxinas estafilocócicas envolve processos diferentes dos utilizados

para detecção de *S. aureus*. A enterotoxina, por apresentar maior resistência, é capaz de manter sua estabilidade frente a condições bruscas e oscilações de temperatura que a cepa produtora não é capaz de suportar. Isso faz com que em alguns casos de intoxicação alimentar só se possa confirmar a ação do *S. aureus* após a aplicação de métodos de detecção de enterotoxinas, já que num primeiro momento, o micro-organismo não é detectado (BERGDOLL, 1990).

Basicamente, se costuma utilizar três tipos de métodos para detectar toxinas em alimentos: *bioassays*, biologia molecular e/ou técnicas imunológicas. Mais recentemente, alguns métodos baseados em espectrometria também foram desenvolvidos e aplicados na detecção de enterotoxinas estafilocócicas.

É possível encontrar uma grande variedade de testes imunológicos comerciais baseados na técnica ELISA disponíveis no mercado para a detecção de enterotoxinas estafilocócicas. Dentre eles, o sistema de triagem automático *VIDAS Staph Enterotoxin II - SET2* (bioMérieux), kit *Tecra (3M)* e *RIDASCREEN SET Total (R-Biopharm AG)*. Todavia, a aplicação destes testes em matrizes alimentares apresenta-se como tarefa dificultosa devido à falta de especificidade e sensibilidade relacionadas aos métodos imunológicos (HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2012). Também é necessário que se obtenha uma quantidade expressiva de toxinas altamente purificadas para a obtenção de anticorpos capazes de serem detectados pelo imunoensaio enzimático. Porém, o processo que envolve a obtenção destas toxinas é altamente custoso. Outro detalhe importante acerca da utilização de testes imunológicos para detecção de enterotoxinas estafilocócicas é a necessidade de adaptar o teste para detecção dos anticorpos correspondentes à toxina de interesse, sendo que só recentemente conseguiu-se desenvolver testes capazes de detectar enterotoxinas além das clássicas.

Enquanto os testes imunológicos apresentam a possibilidade de manifestar falso-positivo pela reatividade cruzada entre os antígenos e demais reações secundárias, os testes de biologia molecular atuam na detecção direta do gene responsável pela produção da toxina, superando esta adversidade (KOHRETT, 2019). Dentre as técnicas mais utilizadas destaca-se novamente a Reação em Cadeia da Polimerase - PCR, que permite a rápida identificação dos genes da enterotoxina, com alta sensibilidade e especificidade, sendo capaz de detectar genes específicos independente da sua expressão. Isto significa que os genes responsáveis pela produção de enterotoxinas precisam estar presentes no substrato avaliado, porém sem a necessidade de estarem ativos. Todavia, as técnicas mais promissoras de detecção de enterotoxina são aquelas que permitem detectar as proteínas envolvidas, como é o caso da Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis - SDS-PAGE*), descrita pela primeira vez por Laemmli (1970). Seu funcionamento baseia-se em determinar a mobilidade das proteínas em gel submetido à corrente elétrica, com as amostras sendo submetidas a aumento de temperatura na presença de SDS e outros agentes redutores que desnaturam proteínas, agindo na dissolução das pontes de dissulfeto, separando as cadeias peptídicas, que podem ser identificadas através dos valores de seus retrospectivos pesos moleculares.

A utilização deste método por EI-Jakee et al. (2013), possibilitou a detecção do perfil proteico de oito cepas enterotoxigênicas de *S. aureus*, onde todos os isolados apresentaram bandas de 26-29 kDA, comprovando a produção de enterotoxinas por cepas de *S. aureus* isoladas de leite cru, iogurte e frango.

A detecção de *S. aureus* e suas enterotoxinas pode ser realizada através de uma série de técnicas diferentes, cada uma com especificidades únicas e características. Até pouco tempo atrás, tal processo só podia ser conduzido através do uso de meios de cultura seletivos, o que tornava o procedimento extremamente lento e com baixa possibilidade de oferecer resultados em poucos dias. Todavia, percebe-se que apesar do grande avanço, os métodos mais eficazes e eficientes ainda estão atrelados a um custo elevado e metodologias complicadas, fatores que podem acarretar em dificuldades na determinação de resultados práticos em casos de surtos alimentares. Dito isso, é factível que os mecanismos de detecção destes micro-organismos e suas toxinas ainda podem ser aprimorados, além de associados às demais técnicas complementares que auxiliem na determinação de concentrações ao longo do tempo.

## 2.6 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A Microbiologia Preditiva é uma área da ciência baseada na premissa de que a cinética de crescimento microbiano está relacionada a condições variáveis reproduzíveis. Dessa forma, ao alterar alguns dos fatores que afetam o desenvolvimento, sobrevivência e inativação bacteriana, é possível prever o comportamento da espécie analisada, em condições similares (ROSS; DALGAARD; TIENUNGOON, 2000).

No ano de 1983, durante o Simpósio da Sociedade de Bacteriologia Aplicada (*Symposium of the Society for Applied Bacteriology*), um painel que contava com 30 especialistas em microbiologia de alimentos previu que havia 80% de chances de se utilizar técnicas preditivas para determinar o tempo de prateleira de produtos diversos ao se observar informações referentes ao crescimento de organismos deteriorantes. Apesar da alta probabilidade obtida, cerca de 25% dos membros do painel não acreditava que tal feito pudesse tornar-se realidade em apenas 10 anos (ROSS; MCMEEKIN, 1994).

A aplicação de modelos matemáticos lineares na cinética de crescimento/inativação microbiana vem sendo estudada desde a década de 1920, com os primeiros exemplos de estudos envolvendo matemática preditiva sendo publicados por Bigelow e Esty (1920), Bigelow (1921) e Esty e Meyer (1922). Contudo, assume-se atualmente que simplificações lineares são, na maioria dos casos, aproximações de padrões microbiológicos complexos (MCMEEKIN; MELLEFONT; ROSS, 2007; PELEG, 1998). Atualmente, existem vários modelos matemáticos que conseguem prever o comportamento microbiano com altas taxas de precisão. Dentre eles, destacam-se os modelos de Jozsef e Terry (1994); Buchanan, Whiting e Damert (1997); Gibson, Bratchell e Roberts (1987) e Huang (2014).

A utilização de modelos preditivos auxilia a responder perguntas de extrema importância para a indústria de alimentos, como por exemplo "qual é o potencial de crescimento de determinada bactéria durante o congelamento?", "qual é a eficácia da pasteurização em determinado produto?", "qual o risco à saúde que este micro-organismo oferece para a produção de toxinas?".

Segundo Monod (1949), o crescimento de culturas bacterianas geralmente obedece regras relativamente simples, apesar da imensa complexidade envolvida nos fenômenos de desenvolvimento microbiano. Sendo assim, a Microbiologia Preditiva pode ser considerada como uma poderosa ferramenta no auxílio à prevenção de exposição humana a patógenos alimentares, através do desenvolvimento de modelos matemáticos que descrevem o efeito dos fatores de controle mais importantes relativos a micro-organismos em alimentos (ROSS; DALGAARD; TIENUNGOON, 2000).

É possível classificar os modelos matemáticos utilizados para avaliar o crescimento microbiano em primários, secundários e terciários. Os primários representam o crescimento de micro-organismos ao longo do tempo para um conjunto de condições ambientais constantes; já os secundários descrevem a dependência de um ou mais parâmetros cinéticos do modelo primário com as condições ambientais às quais o micro-organismo está exposto. Os modelos terciários são produto da combinação dos modelos primários e secundários com o intuito de prever a influência das condições ambientais no crescimento microbiano (WHITING, 1993).

## 2.7 MODELOS MATEMÁTICOS APLICADOS AO CRESCIMENTO DE *S. AUREUS*

Conforme previamente mencionado, modelos lineares não se mostram adequados para previsão de crescimento microbiano, já que a curva de crescimento apresenta formato sigmoidal, numa plotagem semi-logarítmica. O *S. aureus* se enquadra nesta descrição, e por isso pode ter seu desenvolvimento previsto por vários modelos não lineares disponíveis na literatura (FUJIKAWA; MOROZUMI, 2006; LEE et al., 2015; TANGO et al., 2016).

No entanto, nem todos os modelos matemáticos são capazes de prever o crescimento do *S. aureus* e a consequente produção de enterotoxinas com precisão. Fujikawa e Morozumi (2006), avaliaram a aplicação de duas variantes de um modelo desenvolvido anteriormente (FUJIKAWA; KAI; MOROZUMI, 2003). Este novo modelo apresentou resultados satisfatórios para descrever o crescimento e produção de enterotoxinas de *S. aureus* em leite, com regime de temperatura variando entre 14°C e 36,5°C em comparação com o modelo de Baranyi-Roberts. Os resultados mostraram que todos os modelos se mostraram capazes de prever o crescimento microbiano, além de apresentar uma correlação linear entre a produção de SEA faixa de temperatura estudada. Entretanto, nem todos os dados de produção de enterotoxina obedecem uma relação linear.

Gunvig et al. (2018), constataram que apesar da vasta gama de modelos disponíveis para avaliação de crescimento de *S. aureus*, alguns deles foram desenvolvidos considerando a curva de crescimento padrão como sendo de uma cepa desenvolvendo-se em meio líquido e considerando

parâmetro iniciais como 8 logUFC/g, após 40h a 24 °C, com pH de 5.3 e 4% de atividade de água no meio de cultura. Os autores propuseram um novo modelo que foi capaz de estimar que o *S. aureus* não é capaz de desenvolver-se em faixas de pH menores que 5.7.

## 2.8 MODELO DE LUEDEKING-PIRET ASSOCIADO À CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE MONOD

O entendimento dos mecanismos referentes ao processo de fermentação, fez com que inúmeros modelos matemáticos fossem desenvolvidos para prever a taxa de transformação da glicose em ácido láctico. Luedeking e Piret (1959), estudaram a cinética de fermentação da glicose em seis faixas de pH variando entre 4 e 6, mensurando tanto as taxas de formação de ácido láctico, quanto a de crescimento microbiano relativas ao processo. Todas as seis fermentações foram conduzidas à temperatura de 45 °C, com o mesmo organismo (*L. delbrueckii* NRRL-B445). Ao considerarem que a taxa de formação de ácido estava diretamente ligada à taxa de crescimento microbiano e a quantidade de micro-organismos presentes, obtiveram a seguinte equação:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (1)$$

onde  $\alpha$  e  $\beta$  são constantes de proporcionalidade,  $X$  representa a concentração microbiana,  $P$  expressa mg de ácido láctico por mL de solução, e  $t$  o tempo.

Monod (1949) definiu que o crescimento de micro-organismos obedece a cinética de uma reação de 1ª ordem, em relação a sua população, através da equação:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (2)$$

onde  $\mu$  representa a velocidade crescimento específico, a qual pode ser obtida através da seguinte expressão:

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \quad (3)$$

onde  $K_s$  representa a constante de meia velocidade e  $S$  o substrato limitante. Através da Equação 3, pode-se assumir que quando a quantidade de substrato é muito grande, o valor de  $\mu$  é praticamente o mesmo de  $\mu_{max}$ , pois a grande disponibilidade de alimento permite que o micro-organismo em questão desenvolva-se livremente. Ao diminuir-se o valor de  $S$ , o valor de  $\mu$  será exatamente a metade de  $\mu_{max}$  quando o valor de  $K_s$  for igual à  $S$ .

Garnier e Gailliet (2015), associaram as equações de Luedeking-Piret e Monod assumindo que o substrato é consumido para formação de novas células através de uma constante de



rendimento celular ( $Y_{x/s}$ ), negligenciando a taxa de morte celular, de forma que o balanço de massa fica dependente da concentração de biomassa ( $S$ ).

$$\frac{dS}{dt} = -q_s \cdot X \quad (4)$$

onde  $q_s$  representa a taxa de consumo específico de substrato, relacionando-se diretamente com  $\mu$  em:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} \quad (5)$$

E com a constante de rendimento celular ( $Y_{x/s}$ ), através da equação:

$$Y_{x/s} = \frac{dX}{dS} \quad (6)$$

$Y_{x/s}$  também pode ser utilizado para expressar a relação entre o substrato limitante e a concentração microbiana de acordo com:

$$S = \frac{1}{y_{x/s}} \cdot (X_{max} - X) \quad (7)$$

Após combinar as equações 1, 2 e 4, conclui-se que o tempo  $t$  pode ser expresso como:

$$t = a_1 \cdot \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) + a_2 \cdot \ln\left(\frac{(X_{max} - X)}{(X_{max} - X_0)}\right) \quad (8)$$

onde  $a_1$  e  $a_2$  são dados pelas seguintes relações:

$$a_1 = \frac{(K_s \cdot Y_{x/s} + X_{max})}{\mu_{max} \cdot X_{max}} \quad (9)$$

$$a_2 = -\frac{K_s \cdot Y_{x/s}}{\mu_{max} \cdot X_{max}} \quad (10)$$

A reorganização das variáveis permite calcular  $\mu_{max}$  e obter o produto entre  $K_S$  e  $Y_{x/s}$  como:

$$\mu_{max} = \frac{1}{a_1 + a_2} \quad (11)$$

$$K_S \cdot Y_{x/s} = -\frac{a_2}{a_1 + a_2} X_{max} \quad (12)$$

Finalmente, a quantidade de Produto (P) formado pode ser expressa como:

$$P - P_0 = b_1 \cdot (X - X_0) + b_2 \cdot \ln \left( \frac{X_{max} - X}{X_{max} - X_0} \right) \quad (13)$$

onde:

$$b_1 = \alpha + \frac{\beta}{\mu_{max}} \quad (14)$$

$$b_2 = -\frac{\beta \cdot K_S \cdot Y_{x/s}}{\mu_{max}} \quad (15)$$

Os parâmetros do modelo de Luedeking-Piret (Equação 1) podem ser estimados através das Equações 16 e 17.

$$\alpha = b_1 + \frac{b_2}{K_S \cdot Y_{x/s}} \quad (16)$$

$$\beta = -\frac{b_2 \cdot \mu_{max}}{K_s \cdot Y_{x/s}} \quad (17)$$

De forma geral, a equação 1 pode ser escrita como:

$$\frac{1}{N} \frac{dP}{dt} = \alpha k + \beta \quad (18)$$

Uma vez que se divida a equação 1 por  $N$  e que  $k = (1/N)(dN/dt)$ . Com  $k$  sendo a taxa de crescimento específica (logarítmica) e  $N$  a densidade bacteriana.

A obtenção de valores de  $k$  por Luedeking e Piret (1959) para *Lactobacillus delbrueckii* possibilitou a aplicação deste modelo a diversos processos fermentativos. Bischoff (1966), utilizou o parâmetro de  $k$  determinado pelo modelo de Luedeking-Piret para sugerir o design de reatores de fermentação de produção contínua e comparar valores de concentração intermediária e tempo total do processo em reatores de tamanhos diferentes.

### 3 OBJETIVO GERAL

O objetivo desta pesquisa é avaliar a eficácia do modelo matemático de Luedeking-Piret-Monod para prever a produção de enterotoxinas por *Staphylococcus aureus* em diferentes alimentos submetidos a diversas condições de armazenamento.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar em quais condições de temperatura, o modelo descreve melhor os dados experimentais.
- Estimar a dependência dos parâmetros do modelo com as condições ambientais.
- Verificar as condições de validade do modelo.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DADOS EXPERIMENTAIS

Para obtenção de dados referentes ao crescimento e produção de enterotoxinas por *Staphylococcus aureus*, procedeu-se com pesquisa de artigos acadêmicos em bases de dados conhecidas, tais como *ScienceDirect*, *PubMed*, *NCbi* e *Scopus*, utilizando as seguintes palavras-chave: "*Staphylococcus aureus*", "*enterotoxin*", "*production*", "*detection*" e "*modeling*".

Foram selecionados os estudos que expressaram os dados de crescimento e produção de enterotoxina em unidades de UFC/ml e g/ml, e valores proporcionais, respectivamente.

Nos artigos que apresentaram dados de crescimento e produção de enterotoxinas através de gráficos, as imagens foram extraídas em resolução aproximada de pelo menos 854x480, a fim de facilitar a identificação de pontos, linhas e curvas de crescimento. As figuras foram então submetidas ao software *Get Data Graph Digitizer 2.23.0.20*, a fim de realizar a leitura dos pontos cartesianos, os quais foram posteriormente organizados em conjuntos de dados separados. No total, foram selecionados oito artigos acadêmicos e os modelos foram aplicados a 55 curvas de crescimento de *S. aureus*. Cada uma dessas curvas incluía dados de produção de enterotoxina, sendo desse total, 22 curvas de produção de enterotoxina estafilocócica A, 3 curvas de produção de enterotoxina estafilocócica B, 15 curvas de produção de enterotoxina estafilocócica C, 2 curvas de produção de enterotoxina estafilocócica C1, 2 curvas de produção de enterotoxina estafilocócica C2, 2 curvas de produção de enterotoxina estafilocócica H e 9 curvas de culturas mistas capazes de produzir enterotoxinas A, C e D, em temperaturas que variaram de 10 °C a 48 °C, conforme pode ser observado na Tabela 5.

### 4.2 MODELAGEM MATEMÁTICA

Após a obtenção dos dados, procedeu-se com a confecção de *scripts* para tratamento dos dados através de regressão não-linear utilizando o algoritmo de *Levenberg-Marquardt*, a fim de obter valores para os parâmetros de crescimento microbiano, parâmetros empíricos e consequente taxa de produção de toxinas. Foi utilizado a versão 3.5.3 (2019-03-11) – "Great Truth" do programa R Project, associada ao RStudio Version 1.1.463 (R Core Team, 2013; RStudio Team, 2018). Para a regressão não-linear, utilizou-se o pacote *minpack.lm* (ELZHOV et al., 2016). Os dados de tempo ( $t$ ), concentração de *S. aureus* ( $X$ ) e concentração de enterotoxinas ( $P$ ) foram inicialmente adicionados na forma de vetores numéricos ao ambiente R, sendo posteriormente combinados como *data frames* para realização das regressões não-lineares.

### 4.3 CRESCIMENTO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

A Equação 8 foi ajustada aos dados de tempo ( $t$ ) e concentração de *S. aureus*. Nesta regressão, o valor da concentração inicial para *S. aureus* ( $X_0$ ) foi previamente fixado como o valor de  $X$  obtido quando  $t$  apresenta menor valor. Para a estimativa inicial do parâmetro  $X_{max}$ , foi estabelecido um valor ligeiramente superior ao maior valor de  $X$  a fim de evitar indeterminações matemáticas. Os valores de  $a_1$ ,  $a_2$ , foram estimados através da regressão não-linear.

### 4.4 PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

Após a obtenção dos valores dos parâmetros através da primeira regressão não-linear, os dados foram submetidos à uma segunda regressão, desta vez, através do ajuste da Equação 13 aos dados experimentais.

### 4.5 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DOS AJUSTES

Para avaliar os resultados obtidos, classificou-se os conjuntos de dados analisados de acordo com as características das curvas de crescimento e produção de enterotoxina. Após a obtenção dos resultados via regressões não-lineares, procedeu-se com categorização e classificação dos dados através de métodos estatísticos. Foram calculados parâmetros de distribuição para cada variável, e determinou-se curvas de Densidade de Probabilidade. Por fim, averiguou-se a correlação entre os dados através regressões lineares.

A eficácia do modelo de LPM em prever o crescimento de *S. aureus* e produção de enterotoxinas foi averiguada e realizou-se procedimento de simulação destes mesmos parâmetros com modelo mais simples e condições controladas, a fim de confrontar os resultados de ambas as metodologias.

Tabela 5 – Curvas de crescimento de *S. aureus* e de produção de enterotoxinas avaliadas.

Referência	Cepa	Substrato	Enterotoxina	Método de detecção		Tempo	Temperatura (°C)					
				SA	SE							
Fujikawa e Morozumi (2006)	12057	Leite	SEA	Contagem de células	VIDAS Staph Enterotoxin	15 horas	32					
			SEA			35 horas	23					
Sabike et al. (2014)	4, 5 e 13008	Leite com baixa microflora	SEA	PS latex	VIDAS Staph Enterotoxin II	70 horas	36					
			SEA				40					
			SEA				44					
		Leite com alta microflora	SEA				36					
			SEA				40					
			SEA				44					
		Valihrach, Alibayov e Demnerova (2013)	SA 720				Leite	SEC	Contagem em TSA	ELISA	168 horas	10
								SEC				25
SEC	37											
SA 1178	SEC		10									
	SEC		25									
	SEC		37									
SA 1612	SEC		10									
	SEC		25									
	SEC		37									
SA 817	SEC		10									
	SEC		25									
	SEC		37									
SA 1189	SEC		10									
	SEC		25									
	SEC		37									
Min et al. (2013)	ATCC 13565, ATCC 23235, Selvagem	Kimbab	A, C e D	Contagem (Baird Parker)	TECRA SE ELISA	160 horas	17					
			A, C e D			80 horas	20					
			A, C e D			60 horas	23					
			A, C e D			35 horas	28					
			A, C e D			30 horas	30					
		Sanduíches	A, C e D			100 horas	20					
			A, C e D			90 horas	23					
			A, C e D			60 horas	28					
			A, C e D			60 horas	30					
			A, C e D			60 horas	30					
Tsutsuura, Shimamura e Murata (2013)	C-70 (10 <sup>3</sup> )	caldo BHI	SEA	Contagem em placa	Western blot	10 semanas	10					
			SEA			20 dias	15					
			SEA			80 horas	20					
			SEA			30 horas	37					
			SEA			10 semanas	10					
	C-70 10 <sup>(6)</sup>		SEA			20 dias	15					
			SEA			60 horas	20					
			SEA			30 horas	37					
			A, C-102, C-74, C, C-241			SEA	15 semanas	10				
						SEA						
SEA												
Czop e Bergdoll (1974)	S-6	caldo PHP 4%	SEB		Microslide	24 horas						
			SEA			36 horas						
			SEB			29 horas						
			SEA									
Otero et al. (1990)	FRI137		SEC1	Densidade óptica		37						
	FRI361		SEC2									
	L2		SEC2									
	M5		SEC1									
Sakai et al. (2008)	IFH226	caldo BHI	SEA	Contagem em placa	ELISA	24 horas						
			SEH									
			SEB									
			SEH									





## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CLASSIFICAÇÃO DOS CONJUNTOS DE DADOS

De maneira geral, as curvas analisadas apresentaram-se bastante heterogêneas entre si. Este resultado refletiu-se nos valores dos parâmetros obtidos após as regressões não-lineares. Isso foi observado inclusive quando os dados apresentavam similaridades entre si - pouca variação nos valores de concentração de *S. aureus*; mesma variação de tempo e temperatura.

Em estudos realizados por Borst e Betley (1993), Czop e Bergdoll (1974) e Otero et al. (1990), os autores verificaram padrões de produção de enterotoxinas estafilocócicas diferentes para SEA, SEB, SEC e SED. Foi observado que enquanto SEA e SED apresentavam maior taxa de produção durante a fase de crescimento exponencial de *S. aureus*, SEB e SEC eram produzidas somente após o término da fase exponencial. No presente estudo, não foi possível identificar padrões, pois percebeu-se disparidade entre os dados mesmo quando tratava-se da mesma enterotoxina.

Também é necessário mencionar que alguns conjuntos de dados apresentaram função decrescente ou valores de medição negativos para enterotoxinas. No caso do trabalho conduzido por Otero et al. (1990), atribuiu-se os valores negativos para SEC ao método de detecção *microslide* utilizado, enquanto nos dados fornecidos pelo trabalho de Min et al. (2013), há de se considerar que foi medida a produção de enterotoxinas em meio sólido, mais especificamente em sanduíches e kimbabs. Além disso, foram mensuradas concentrações de SEA, SEC e SED simultaneamente com uso de teste TECRA. Neste caso cita-se a influência da matriz alimentar no crescimento de *S. aureus*, mas não são dadas justificativas para a diminuição dos níveis de enterotoxina ao longo do tempo, em temperaturas variadas.

Sendo assim, devido à grande heterogeneidade dos dados, optou-se por classificar as curvas de acordo com suas características, a fim de organizar os dados. Foram adotados alguns parâmetros para o procedimento de classificação, tanto para as curvas de crescimento de *S. aureus* (SA), quanto para as curvas de produção de enterotoxina (SE). Após a definição de parâmetros de classificação adequados, as curvas foram analisadas individualmente e rotuladas de acordo com os parâmetros estabelecidos. Os critérios de classificação estão apresentados na Tabela 6. As notas atribuídas para cada curva, bem como os valores dos parâmetros para cada regressão não-linear podem ser observados na Tabela 19, a qual pode ser encontrada no apêndice A.

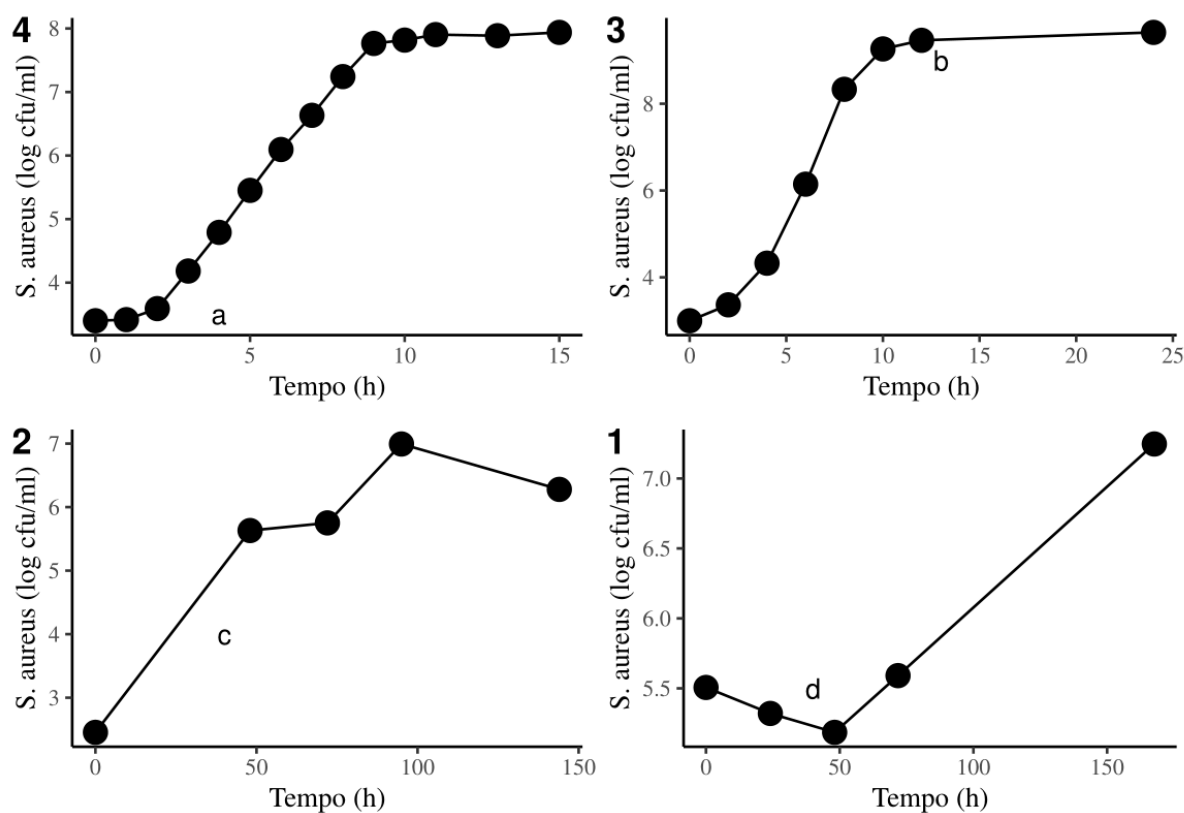
A Figura 7 apresenta exemplos de curvas de crescimento de *S. aureus* classificadas com notas 4, 3, 2 e 1, respectivamente. Percebe-se que a curva de nota 4 apresenta maior quantidade de pontos referentes ao crescimento microbiano ao longo do tempo (a), o que permite obter melhor definição acerca das fases de crescimento do *S. aureus*. A curva de nota 3 aponta para uma fase de adaptação (lag) bem definida. Todavia, ao se examinar as medições realizadas durante a fase estacionária (b), percebe-se um considerável intervalo de tempo entre os dois

Tabela 6 – Critérios de classificação para curvas de crescimento de *S. aureus* (SA) e produção de enterotoxinas (SE).

SA	SE	Nota
Fases de desenvolvimento bem definidas crescimento não decrescente	Ponto de início de produção de enterotoxina bem definido e crescimento não decrescente	4
Fases de desenvolvimento não tão definidas e máximo de 1 (um) ponto divergindo de crescimento não decrescente	Ponto de início de produção de enterotoxina não tão definido e pelo menos um ponto divergindo de crescimento não decrescente	3
Fases de desenvolvimento não definidas e até 30% dos pontos divergindo de crescimento não decrescente	Ponto de início de produção de enterotoxina não tão definido e até 30% dos pontos ponto divergindo de crescimento não decrescente	2
Fases de desenvolvimento indefinidas e mais de 30% dos pontos divergindo de crescimento não decrescente	Ponto de início de produção de enterotoxina indefinido e mais de 30% dos pontos ponto divergindo de crescimento não decrescente	1

últimos pontos, o que impossibilita determinar se houve variação na concentração de *S. aureus* naquele intervalo de tempo. Há de se considerar que após o início do processo de produção de enterotoxinas, pode haver oscilações na quantidade de micro-organismos.

Figura 7 – Exemplos de curvas de crescimento de SA classificadas de acordo com os critérios de desempenho.



Fonte: (4)(FUJIKAWA; MOROZUMI, 2006); (3)(SAKAI et al., 2008); (2)(MIN et al., 2013); (1)(VALIHRACH; ALIBAYOV; DEMNEROVA, 2013).

A figura atribuída à curva de nota 2 não apresenta definição das fases de desenvolvimento

microbiano (c) e apresenta função decrescente no intervalo de tempo compreendido entre 100 e 150 horas, necessitando portanto, de maior quantidade de pontos para entender o comportamento do *S. aureus*. Por fim, a figura de nota 1 não apresenta claramente nenhuma fase de crescimento, além de apresentar função decrescente na maior parte dos pontos observados.

O mesmo procedimento foi realizado para os conjuntos de dados referentes a produção de enterotoxinas estafilocócicas analisadas, conforme pode ser observado na Figura 8. As curvas atribuídas às notas 4 e 3 aparentemente não possuem grandes diferenças no aspecto visual. Entretanto, a curva de nota 4 apresenta maior definição na fase de início de produção de toxinas (a), com maior quantidade de medidas tomadas no mesmo intervalo de tempo em relação à curva de nota 3; que também não exibe dados intermediários referentes à produção de enterotoxinas (b), após a fase inicial.

O conjunto de dados para os quais foi atribuída a nota 2 exibem uma função de crescimento decrescente logo após a primeira medição, tornando a fase inicial de produção de enterotoxinas inconsistente quando comparada a outros conjuntos de dados (c). Já a curva de nota 1, apresenta um grande intervalo tempo entre a primeira e a segunda medição em sentido decrescente. O mesmo pode ser observado entre o segundo e terceiro ponto, o que indefine a fase de início de produção de enterotoxinas.

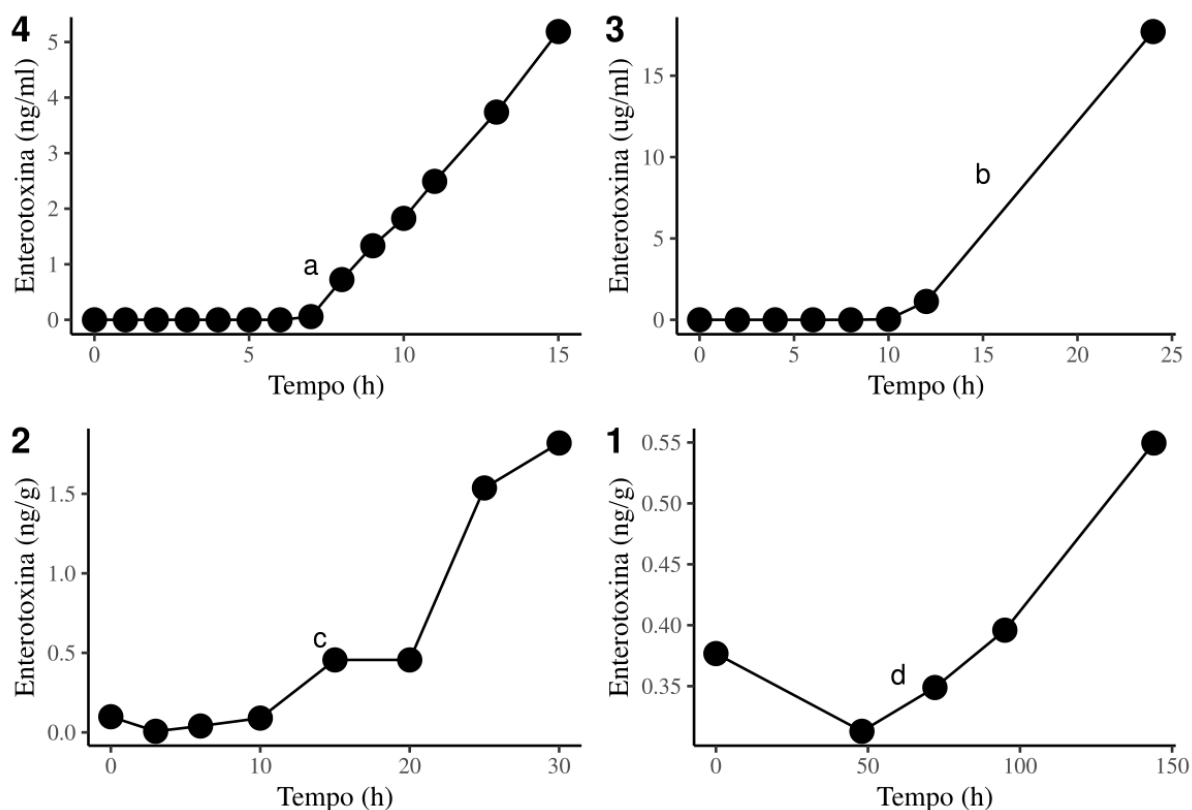
A Figura 9 apresenta um histograma das notas atribuídas para cada conjunto de dados. Observa-se que a maior parte das curvas apresenta uma classificação intermediária evidenciando que na maior parte dos conjuntos de dados estão faltando elementos que permitem a sua boa caracterização. Tal afirmação pode ser corroborada pelos valores da média de notas de cada conjunto de curvas analisadas, que em ambos os casos distribuiu-se na faixa entre as notas 2 e 3, sendo a média igual a 2,31 para SA e 2,51 para SE.

A Tabela 17 (vide Apêndice) apresenta os resultados obtidos para os parâmetros  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $X_{max}$ ,  $b_1$  e  $b_2$  após o ajuste do modelo de Luedeking-Piret-Monod (LPM) para cada um dos 55 conjuntos de dados experimentais. Nota-se que devido à já mencionada grande heterogeneidade dos dados, há uma grande discrepância nos valores estimados para cada parâmetro ao longo das diferentes curvas. Portanto, não é possível estabelecer de imediato valores típicos para cada parâmetro.

Ao analisar os resultados obtidos através da primeira regressão não-linear - que tinha como objetivo estimar os valores de  $a_1$ ,  $a_2$  e  $X_{max}$ , observou-se que das 55 curvas analisadas, 44 apresentaram valores positivos para  $a_1$  e 27 para  $a_2$ . Todavia, houve grande variação na grandeza dos valores destes dois parâmetros, sendo que a amplitude para o parâmetro  $a_1$  é de 9.312, e para o parâmetro  $a_2$  de 28.447.

Os dados obtidos através da segunda regressão não-linear -  $b_1$ ,  $b_2$  e  $p_0$ , mostraram-se igualmente heterogêneos, não permitindo estabelecer, a priori, correlações entre os parâmetros empíricos.

Figura 8 – Exemplos de curvas de produção de SE classificadas de acordo com os critérios de desempenho.



Fonte: (4)(FUJIKAWA; MOROZUMI, 2006); (3)(SAKAI et al., 2008); (2),(1):(MIN et al., 2013).

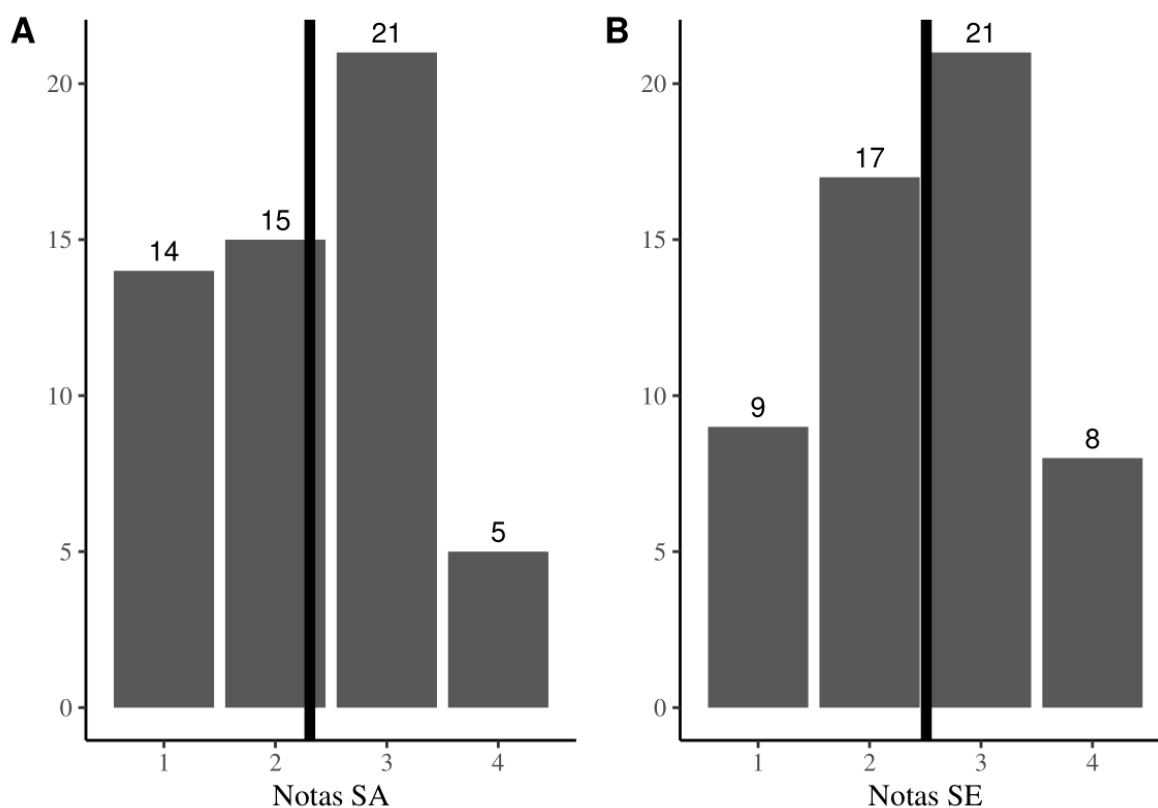
Com o intuito de se avaliar melhor a faixa de valores possíveis dos resultados dos modelos, foram calculadas as distribuições de probabilidade dos valores possíveis para cada parâmetro. A Tabela 7 apresenta um sumário descritivo da distribuição dos valores de  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $b_1$  e  $b_2$ . O valor obtido para o desvio-padrão e o coeficiente de variação elevado evidenciam a heterogeneidade dos dados, enquanto a obliquidade, curtose e faixa interquartílica (iqr) dão ideia de suas distribuições.

Tabela 7 – Resultados dos parâmetros  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $b_1$ ,  $b_2$ .

Parâmetro	Média	D. Padrão	C. Var	Obliquidade	Curtose	iqr	Range 98%	
$a_1$	255	1.346	5,3	0,93	8,1	248	-3.077	4.550
$a_2$	374	3.779	10	-1,50	12	73	-1,4E+04	9.455
$b_1$	17	137	8,0	6,30	45	3,3	-117	548
$b_2$	4.448	3,6E+04	8,1	7,20	53	4,0	-7.012	1,2E+05

O desvio-padrão observado para os quatro parâmetros analisados aponta para valores muito acima da média em todos os casos, o que comprova que o modelo apresentou resultados divergentes entre as curvas examinadas, indicando que a distribuição destes valores não se

Figura 9 – Distribuição das curvas de crescimento de SA e das curvas de produção de SE classificadas de acordo com os critérios de desempenho.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

concentra próximo da Média - conclusão corroborada também pelo coeficiente de variação.

Além disso, é possível constatar a enorme amplitude que compreende o intervalo onde estão distribuídos os valores de cada parâmetro. A Tabela 7 também mostra que 98% das medidas de  $a_1$ , concentram-se no intervalo compreendido entre -3.077,19 a 4.550,28. Nota-se que  $b_2$  é o parâmetro com a maior amplitude observada até então. Os valores de curtose evidenciam uma distribuição de valores mais afunilada e concentrada, bem como a presença de *outliers* nos conjuntos de dados  $b_1$  e  $b_2$ .

Outro fator que ajuda a corroborar a desarmonia dos dados é a obliquidade, que mensura a assimetria das caudas da distribuição. Considerando que valores próximos de zero denotam distribuições simétricas, constata-se que  $b_1$  e  $b_2$  possuem maior assimetria quando comparados à  $a_1$  e  $a_2$ , o que pode estar relacionado com a maior precisão envolvida no procedimento de construção de curvas de crescimento de *S. aureus*, já que as medições podem ser efetuadas através da simples contagem de placas, enquanto a produção de enterotoxinas demanda testes mais sofisticados e complexos. A obliquidade também permite afirmar que  $a_1$ ,  $a_2$  e  $b_2$  possuem cauda de distribuição à direita, o que indica maior quantidade de valores acima da média, enquanto  $a_2$  possui cauda de distribuição à esquerda, o que implica em maior quantidade de valores abaixo

da média.

Os resultados referentes à faixa interquartilica (iqr), constantes na Tabela 7 expressam a dispersão de 50% dos valores ao longo dos percentis 0,25 e 0,75. O alto valor de iqr para  $a_1$  demonstra sua distribuição próxima da média e concentrada no quartil 0,50, como pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8 – Percentis para os parâmetros  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $b_1$  e  $b_2$  obtidos a partir das curvas com melhores notas.

Parâmetro	p0.05	p0.25	p0.50	p0.75	p0.90	p0.95
$a_1$	-1.139	2,15	7,60	250,62	1.257	3.100
$a_2$	-941	-4,79	-0,78	68,40	3.677	6.867
$b_1$	-65	-0,58	-0,02	2,68	21	35
$b_2$	-3.500	-3,50	-0,08	0,54	94	340

Após a obtenção dos parâmetros empíricos através das regressões não-lineares, foi possível calcular os valores dos parâmetros originais do modelo:  $\mu_{max}$ ,  $K_s \cdot Y_{x/s}$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ , através das equações 11, 12, 16 e 17, para cada conjunto de dados. Estes resultados foram então submetidos à mesma análise dos parâmetros  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $b_1$  e  $b_2$ , a fim de se determinar suas distribuições e estabelecer relações entre seus valores e as notas dos conjuntos de dados.

Tabela 9 – Resultados dos parâmetros  $\mu_{max}$ ,  $K_s \cdot Y_{x/s}$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ .

Parâmetro	Média	D. Padrão	C. Var	Obliquidade	Curtose	iqr	Range	98%
$\mu_{max}$	0,04	0,26	6,1	2,00	14	0,06	-0,58	0,97
$K_s \cdot Y_{x/s}$	-26	120	-4,6	-6,20	42	14	-538,42	38,22
$\alpha$	0,89	6,80	7,7	0,91	11	1,20	-20,10	23,91
$\beta$	0,14	0,46	3,2	4,60	24	0,09	-0,06	2,30

Analisando a Tabela 9, percebe-se novamente a ineficácia do modelo em prever valores padronizados. Da mesma forma, como acontece com  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $b_1$  e  $b_2$ , os valores de desvio-padrão apresentaram-se maiores do que a média em todos os casos, evidenciando a grande distância dos valores em relação à própria média. Também constata-se que os valores de  $\alpha$  são os que apresentam maior valor de desvio-padrão em relação à média.

A variável  $\mu_{max}$  está diretamente ligada aos valores de  $a_1$  e  $a_2$ . Os valores calculados com base nos resultados do modelo apresentam valores de desvio-padrão 6.1 vezes maior do que a média (dado pelo coeficiente de variação), através do coeficiente de variação, não permitindo que o valor 0.04 represente efetivamente os conjuntos de dados analisados. Tal conclusão pode ser comprovada pelos valores de obliquidade, que por apresentar-se maior que 0, indica que a distribuição acontece à direita da média de 0.04; e pelo valor de curtose, que caracteriza uma função leptocúrtica.

Ainda no diagnóstico da distribuição dos valores de  $\mu_{max}$ , pode-se concluir que o baixo valor de amplitude interquartílica (iqr) denota que 50% dos valores de  $\mu_{max}$  variam em valor maior do que a média, evidenciando mais uma vez que o valor da média não representa os conjuntos de dados e que sofreu influência de *outliers*. Dessa forma, infere-se que a falta de padrão nos valores de  $\mu_{max}$  - que representa a velocidade de crescimento de *S. aureus*, advém da heterogeneidade das curvas de crescimento analisadas neste trabalho.

Conforme mencionado anteriormente,  $K_s$  representa a constante cinética estabelecida por Monod (1949), e  $Y_{x/s}$  representa a taxa de consumo de substrato. Apesar do trabalho de Garnier e Gaillet (2015) não apresentar equações para o cálculo individual destes parâmetros, os autores obtiveram uma expressão para o cálculo de seu produto (Equação 12). Este valor é necessário para calcular-se os valores de  $\alpha$  e  $\beta$ . Sua obliquidade denota que seus valores distribuem-se à esquerda (abaixo) da média, caracterizando forte presença de valores negativos. Além disso, 98% dos valores de  $K_s \cdot Y_{x/s}$  encontram-se distribuídos entre -538.42 e 38.22.

A produção de toxinas é dependente dos valores de  $\alpha$  e  $\beta$  conforme se observa na Equação 1, sendo  $\alpha$  parâmetro que multiplica a taxa de crescimento de micro-organismos e  $\beta$  o valor instantâneo da concentração de micro-organismos. Da mesma forma que os demais parâmetros analisados neste trabalho, nota-se uma assimetria na distribuição dos dados para estas duas variáveis. Apesar de  $\alpha$  apresentar-se com o menor valor de obliquidade, seu alto coeficiente de variação demonstra como a média dos valores não representa o conjunto de dados; por fim,  $\beta$  apresenta valores menores de de variação e 98% destes valores distribuídos entre -0.06 e 2.30.

Tabela 10 – Percentis para os parâmetros  $\mu_{max}$ ,  $K_s \cdot Y_{x/s}$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  obtidos a partir das curvas com melhores notas.

Parâmetro	p0.05	p0.25	p0.50	p0.75	p0.90	p0.95
$\mu_{max}$	-0,31	0,00	0,00	0,06	0,17	0,29
$K_s \cdot Y_{x/s}$	-57,01	-12,65	-0,68	1,51	3,50	7,13
$\alpha$	-4,09	-0,37	0,02	0,87	7,52	8,11
$\beta$	-0,01	0,00	0,01	0,09	0,16	2,75

A Tabela 10 apresenta os valores de distribuição dos parâmetros nos percentis 0.05, 0.25, 0.50, 0.75, 0.90 e 0.95. Estes valores são úteis para se identificar os possíveis *outliers*, os quais poderiam ser dados pelos 25% valores inferiores de cada parâmetro.

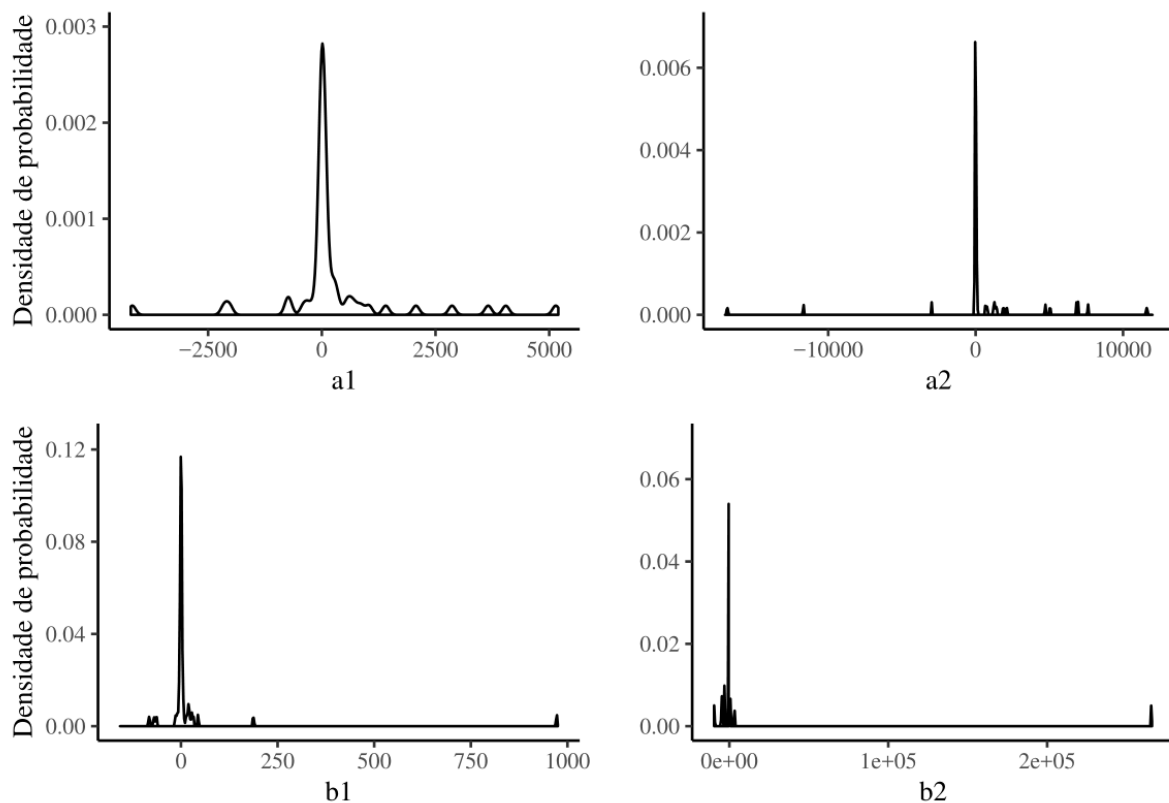
## 5.2 VALORES DE REFERÊNCIA

A adoção de um sistema de classificação das curvas analisadas permitiu relacionar a qualidade dos dados de entrada com os dados de saída. De maneira simples, assumiu-se que os parâmetros obtidos após o ajuste do modelo LPM aos dados referentes às curvas de crescimento de *S. aureus* (5 curvas) e de produção de enterotoxina (8 curvas) com nota 4 seriam os valores de referência para mensurar a qualidade dos dados obtidos. Sendo assim, os valores dos parâmetros

$a_1$ ,  $a_2$ ,  $b_1$  e  $b_2$  gerados por estes conjuntos de dados foram considerados para a obtenção dos intervalos de resultados como ideais para o modelo.

Para se determinar valores adequados para os parâmetros, foram construídas curvas da densidade de probabilidade para cada um deles, conforme mostra a Figura 10. A análise da Figura 10 permite observar que para as curvas consideradas, os 4 parâmetros tendem a se concentrar em torno de uma faixa bem mais restrita de valores, os quais foram determinados por interpolação linear. Finalmente, estimou-se a área compreendida (probabilidade de ocorrência) dos valores integrando-se as curvas da função de densidade de probabilidade para cada parâmetro.

Figura 10 – Distribuições de probabilidade dos parâmetros  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $b_1$  e  $b_2$  para as curvas com nota igual a 4.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

A Tabela 11 apresenta os limites utilizados para o cálculo das funções de densidade, bem como a probabilidade de se obter valores compreendidos dentro do intervalo de referência para cada parâmetro. Percebe-se que em todos os casos a probabilidade fica abaixo de 0.5, o que demonstra a ineficácia do modelo em prever resultados homogêneos.

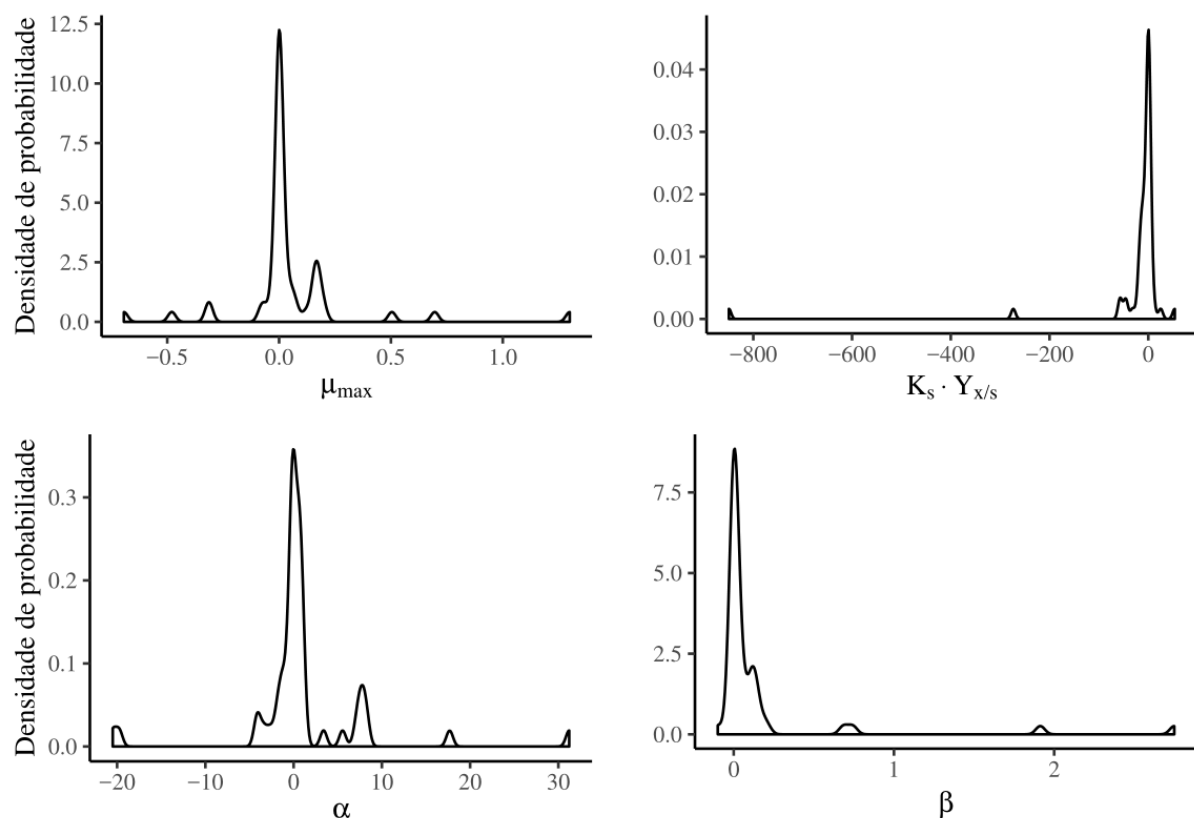
Os dados referentes aos parâmetros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\mu_{max}$  e  $K_s \cdot Y_{x/s}$  também foram distribuídos em curvas de densidade de probabilidade para se obter valores dentro do intervalo de referência. As curvas de densidade de probabilidade podem ser observadas na Tabela 13 e os valores de limites



Tabela 11 – Limites e probabilidades obtidos através da integralização das curvas de densidade de probabilidade para  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $b_1$  e  $b_2$ .

Parâmetro	Limites		Probabilidade
$a_1$	2,8801	19,4981	0,0473
$a_2$	-5,2506	-0,7834	0,4914
$b_1$	-0,0957	31,485	0,0473
$b_2$	-38,249	-0,6549	0,3216

mínimos e máximos para  $\mu_{max}$ ,  $K_s \cdot Y_{x/s}$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ , bem como suas respectivas probabilidades estão apresentados na Tabela 12

Figura 11 – Distribuições de probabilidade dos parâmetros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\mu_{max}$  e  $K_s \cdot Y_{x/s}$  para as curvas com nota igual a 4.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

As probabilidades correspondentes aos parâmetros  $\mu_{max}$  e  $K_s \cdot Y_{x/s}$  apresentaram valores superiores à 0,5, o que demonstra que o modelo de Luedeking-Pirett-Monod é capaz de gerar valores tidos como de referência para estas duas variáveis. Todavia, tanto o valor de probabilidade de  $\alpha$  quanto o valor de  $\beta$  mostram-se menores do que 25%, o que afeta diretamente os resultados de taxa de produção de enterotoxina obtidos através deste modelo.

Os erros obtidos através dos ajustes dos dados encontram-se nas Tabelas 17 e 18 (Apên-

Tabela 12 – Limites e probabilidades obtidos através da integralização das curvas de densidade de probabilidade para  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\mu_{max}$  e  $K_s \cdot Y_{x/s}$ .

Parâmetro	Limites		Probabilidade
$\mu_{max}$	-0,6941	0,1195	0,7834
$K_s \cdot Y_{x/s}$	-31,665	1,8789	0,6144
$\alpha$	-1,3438	-0,2575	0,2155
$\beta$	0,0277	0,1052	0,2375

dice). Neste trabalho, como há uma grande variação nos valores de enterotoxina relatados nos diferentes artigos, optou-se por analisar de forma mais detalhada o erro percentual médio, o qual é independente da escala dos valores. Esta medida é muito afetada por valores muito pequenos de enterotoxina, os quais são observados em muitas curvas. Por exemplo, se a concentração de enterotoxina for igual a 0,01 ng/g e o modelo predizer 0,2 ng/g, o erro percentual equivalente é igual a 1900% para um desvio absoluto de 0,19 ng/g. Para se evitar essa situação, o erro percentual médio foi dividido em duas contribuições: uma para valores de enterotoxina inferior a 1 ng/g e outro para as demais concentrações de enterotoxina. Com o intuito de se avaliar a influência das notas atribuídas às curvas sobre o erro percentual médio obtido após o ajuste do modelo LPM foram realizadas regressões lineares e regressões lineares generalizadas que expressaram o erro percentual médio em função da nota para a curva de crescimento de SA, da nota para a produção de SE, do valor máximo de enterotoxina produzido e do número de pontos da curva. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados das regressões lineares entre o Erro Percentual Médio de SE e demais parâmetros.

Regressão	Valor est.	Erro Padrão	<i>t</i> – value	<i>p</i> – value	Significância
<b>1) EPM (SE) + Número de pontos observados</b>					
C. linear	-1,24E+05	5,72E+04	-2,164	3,50E-02	0,05
N. Pontos	-1,69E+04	5.184	3,267	1,91E-03	0,01
<b>2) EPM (SE) + <math>P_{max}</math></b>					
C. linear	-3.252	2,93E+04	-0,111	0,912	-
Pmax	3,30E+08	7,03E+07	4,699	1,90E-05	0,001
<b>3) EPM (SE) + Erros estatísticos</b>					
C. linear	-3,80E+04	3,62E+04	-1,050	0,299	-
RMSE	3,88E+05	2,35E+04	16,523	<2e-16	0,001
MAE	-4,59E+05	2,84E+04	-16,185	<2e-16	0,001
R2	1,47E+04	4,82E+04	0,304	0,762	-
<b>4) EPM (SE) + Soma das notas de SA e de SE</b>					
C. linear	4.777	2,14E-01	22,3	<2e-16	0,001
(SA + SE)	1,23E-04	8,67E-05	1,414	0,163	-

Na Regressão 1, o objetivo foi verificar a existência de linearidade entre o Erro Percentual

Médio - EPM e o Número de pontos observados em cada um dos conjuntos de dados - NP. Após realizar a regressão, foi possível constatar através dos resultados que existe linearidade entre estes dois parâmetros, - ainda que bastante sutil, com grau de significância de 0,01.

Também foi possível constatar linearidade entre o EPM e o valor de  $P_{max}$  para cada conjunto de dado, embora o modelo linear não explique essa relação de forma completa (o valor de  $P$  foi igual a 0,912 para o coeficiente linear). Dessa forma, foi possível correlacionar o erro obtido pelas regressões com o nível de precisão dos testes de detecção de enterotoxina realizado em cada estudo, uma vez que quanto mais preciso o teste utilizado, maior é a precisão do modelo LPM.

A Regressão 3 foi realizada a fim de observar uma possível linearidade entre os dados de EPM, e os valores de Erros Estatísticos obtidos - RMSE, MAE e R2. Observou-se um baixo valor de  $p$  para RMSE e MAE, evidenciando a linearidade entre os parâmetros, embora o modelo linear mais uma vez não tenha sido totalmente eficaz para descrever os resultados.

Tabela 14 – Resultados das regressões lineares entre o Erro Percentual Médio para  $P > 1$  e  $P < 1$  e demais parâmetros.

Regressão	Valor est.	Erro Padrão	$t - value$	$p - value$	Significância
<b>1) EPM para <math>P &gt; 1</math> + Número de pontos</b>					
C. linear	-4,29E+05	2,45E+05	-1,751	0,0889	0,1
N. pontos	-5,37E+04	1,96E+04	2,742	0,0097	0,01
<b>2) EPM para <math>P &gt; 1</math> + Soma das notas de SA e de SE</b>					
C. linear	5,113	2,520e-01	20,29	<2e-16	0,001
N. pontos	3,781e-05	3,000e-05	1,26	0,216	-
<b>3) EPM para <math>P &lt; 1</math> + Número de pontos</b>					
C. linear	-14,636	20,450	-0,716	0,4783	-
N. pontos	-5,508	1,719	3,204	0,0027	0,01
<b>4) EPM para <math>P &lt; 1</math> + Soma das notas de SA e de SE</b>					
C. linear	2,4283	0,1683	14,429	<2e-16	0,001
N. pontos	0,2980	0,1883	1,583	0,121	-

A Tabela 14 apresenta os valores das regressões lineares conduzidas para os conjuntos de dados que apresentaram valores de  $P$  maior e menor do 1 (um), respectivamente. Mais uma vez observou-se que o número de pontos foi a variável mais relevante para explicar os valores de erros obtidos.

Portanto, foi observado de uma forma geral que o modelo de Luedeking-Piret-Monod não foi adequado para descrever os dados de produção de enterotoxina e de crescimento de *S. aureus*. Isto se deve à grande heterogeneidade das curvas, o que exigiria um maior número de parâmetros para descrever comportamentos bem diferentes entre si. Outro aspecto importante é que o número de pontos experimentais é mais significativo para o ajuste do modelo aos dados

do que o padrão dos pontos - dado pelas notas. Embora não seja possível atribuir um valor ótimo para o número de pontos disponíveis, é desejável que se tenha um número suficiente para que todos os estágios de crescimento bacteriano e de produção de enterotoxina sejam bem caracterizados.

Para se estudar melhor os dados de produção de enterotoxina, foram feitas algumas simulações a partir de números aleatórios (Simulação de Monte Carlo) com o intuito de se descrever quais parâmetros são mais relevantes para explicar os resultados. A próxima seção apresenta estas simulações.

### 5.3 SIMULAÇÕES DO CRESCIMENTO DE *S. AUREUS* E PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS

Para simular o crescimento de *S. aureus* foi utilizado um modelo com as seguintes hipóteses: população inicial de 20 bactérias (aproximadamente 1,3 logaritmos), sendo que cada uma dessas bactérias possuía um valor diferente para os seguintes parâmetros: duração da fase lag ( $t_{lag}$ ), tempo para início da produção de enterotoxina ( $t_{star}$ ), tempo em que se inicia a fase estacionária ( $t_{stat}$ ); taxa específica de crescimento ( $\mu$ ); taxa de consumo de substrato para formação de biomassa ( $Y_{x/s}$ ); taxa de consumo de substrato para produção de enterotoxina ( $Y_{px}$ ). Assumiu-se que todos esses parâmetros eram normalmente distribuídos com médias e desvios-padrão conhecidos. Além disso, todas as bactérias descendentes possuíam os mesmos parâmetros de suas genitoras. A Equação 19 foi utilizada para expressar a duplicação bacteriana durante a fase de crescimento exponencial.

$$X = X_0 \cdot 2^{\frac{t-t_{lag}}{t_d}} \quad (19)$$

Onde  $X$  e  $X_0$  representam a concentração final e inicial de *S. aureus*,  $t_{lag}$  o tempo de duração da fase lag,  $t_d$  o tempo necessário para duplicação celular e  $t$  o tempo total observado.

A Equação 20 foi utilizada para simular a produção de toxina, onde  $P$  e  $P_0$  representam as concentrações final e inicial de enterotoxina estafilocócica, respectivamente e  $Y_{px}$  a taxa de produção de enterotoxina por bactéria.

$$P = P_0 + \log_{10} X \cdot Y_{px} \quad (20)$$

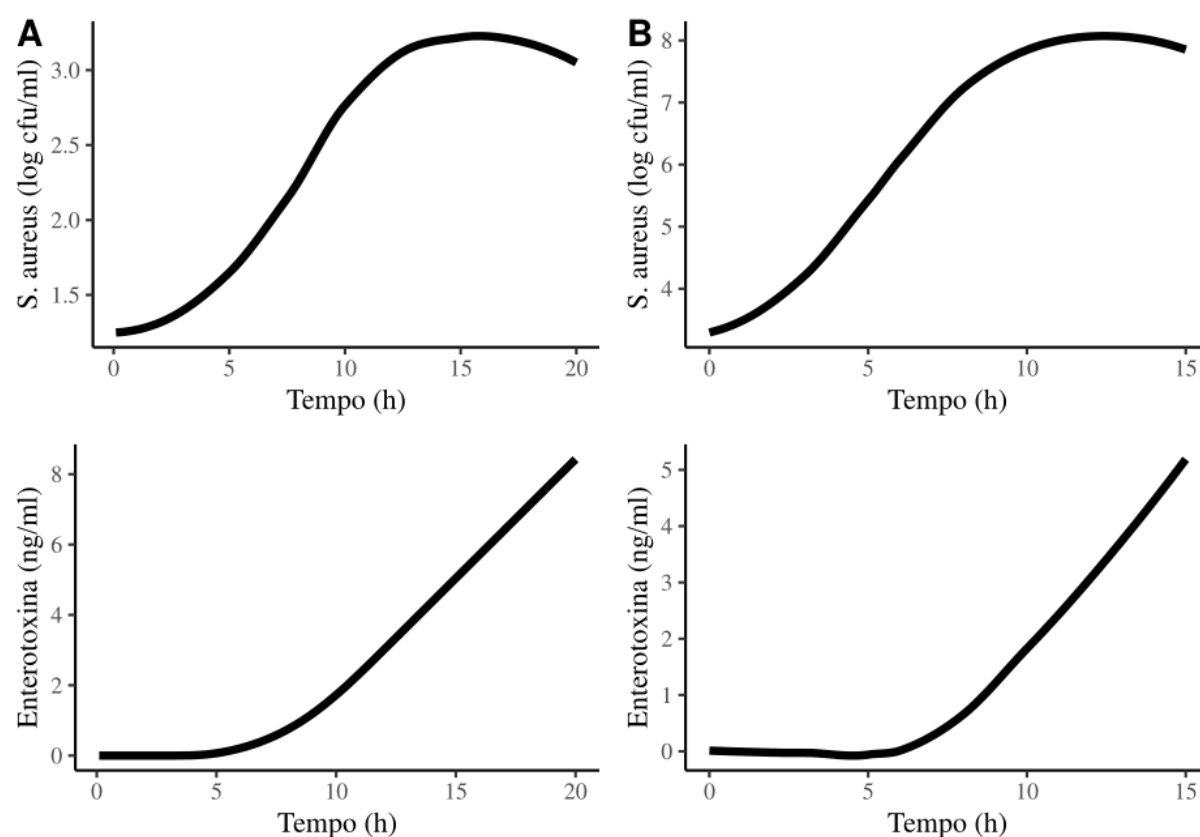
Com este modelo relativamente simples, foi possível obter-se uma curva de crescimento bacteriano e de produção de enterotoxinas de comportamento similar ao observado no trabalho de Fujikawa e Morozumi (2006) para produção de enterotoxina em leite a 32 °C. Os parâmetros utilizados para a simulação podem ser conferidos na Tabela 15.

A Figura 12 apresenta a comparação entre a simulação e as curvas experimentais. Observa-se que as duas curvas têm o mesmo formato com uma diferença de escala: A população inicial

Tabela 15 – Parâmetros para primeira simulação.

Parâmetro	Valor Médio	D. Padrão
Tempo da fase lag	15	5
Tempo da fase exponencial	40	6
Tempo da fase estacionária	100	10
$\mu$	1E-03	5E-05
$Y_{px}$	2E-03	5E-04
$X_0$	20	-

Figura 12 – Comparação entre curvas de crescimento de SA e produção de SE em leite a 32 °C.  
a) Simulação, b) Experimental.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

bacteriana da curva experimental é de aproximadamente 3 logaritmos enquanto que a da simulação é de aproximadamente 1,3 logaritmos e na curva experimental a produção de toxina começa em 7 horas enquanto que na simulação, que se inicia em aproximadamente 70 horas.

Tanto o crescimento bacteriano quanto a produção de enterotoxinas são diretamente afetados pela variação de temperatura. Tanto o aumento quanto a redução de temperatura agem na taxa de divisão celular, permitindo que se controle a cinética microbiana. Nesta simulação, embora não haja nenhum termo explícito para representar a temperatura, esta termina por afetar

a taxa de crescimento, a qual está relacionada ao tempo para duplicação conforme expressa a Equação 19.

A Tabela 16 e a Figura 13 apresentam os parâmetros utilizados e as curvas geradas para uma nova rodada de simulações. Assim como na primeira simulação, foi possível obter-se curvas com um padrão de comportamento similar em relação aos valores experimentais de produção de enterotoxina em leite a 23 °C (FUJIKAWA; MOROZUMI, 2006).

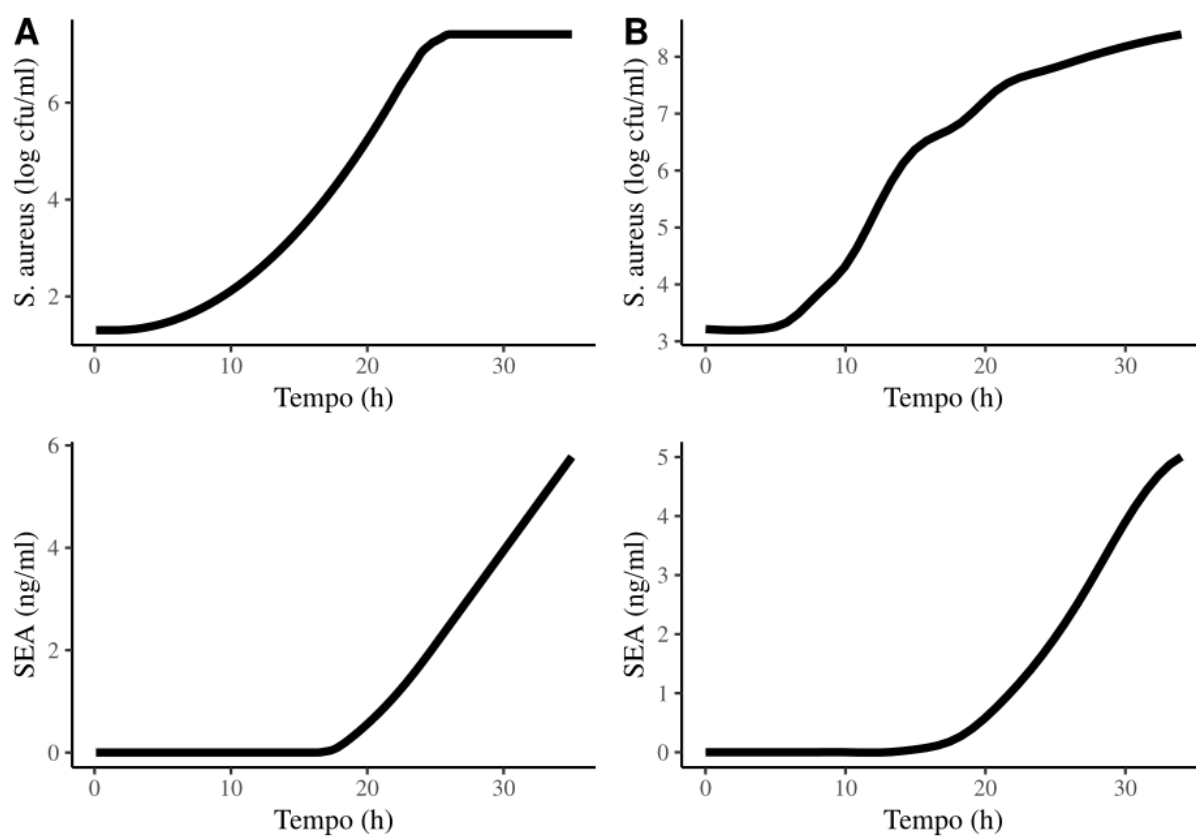
$$td = \frac{\log_{10} 2}{\mu} \quad (19)$$

Tabela 16 – Parâmetros para a segunda simulação.

Parâmetro	Valor Médio	D. Padrão
Tempo da fase lag	15	3
Tempo da fase exponencial	17,5	5
Tempo da fase estacionária	24	10
$\mu$	5E-04	5E-05
$Y_{px}$	5E-05	5E-04
$X_0$	20	-

Observa-se que estas simulações foram realizadas para reproduzir os resultados experimentais de curvas com um padrão bem definido de comportamento. Este modelo simples utilizado para as simulações também não é capaz de descrever as curvas cujo comportamento não está bem definido (portanto, foram classificadas com notas baixas). Para se reproduzir estas curvas, seriam necessários parâmetros adicionais que considerassem diferentes eventos como, por exemplo, a taxa de letalidade das bactérias em função da quantidade de enterotoxinas, uma taxa de deterioração das enterotoxinas e uma quantidade maior de substratos com taxas de consumo diferentes entre si.

Figura 13 – Comparação entre curvas de crescimento de SA e produção de SE em leite a 23 °C.  
a) Simulação, b) Experimental.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.





## 6 CONCLUSÃO

O modelo de LPM foi originalmente designado para prever a produção de ácido láctico em reatores microbianos relacionados à processos fermentativos. Nesse tipo de processo, em geral as condições são muito bem controladas e otimizadas de forma a facilitar a produção da substância de interesse por parte dos micro-organismos. Nesse sentido, podem ser encontrados na literatura muitos modelos que são capazes de reproduzir os resultados experimentais com precisão. Todavia no que diz respeito à produção de enterotoxinas por *Staphylococcus aureus*, a situação é bem diversa.

Alimentos em geral apresentam-se como um meio complexo onde algumas substâncias podem ser consumidas por micro-organismos. No entanto, a disponibilidade destas substâncias varia conforme o tipo de alimento, podendo apresentar alta heterogeneidade, afetando diretamente a cinética de crescimento e produção de compostos metabólicos. Além disso, com frequência observa-se a presença de uma flora bacteriana nativa, a qual pode interagir de forma favorável ou não com o *S. aureus*. Outra dificuldade reside no fato que as condições de processamento e/ou armazenamento não são tão bem controladas quanto em um processo fermentativo, sendo em geral não homogêneas. Portanto, um modelo matemático que seja capaz de descrever a produção de enterotoxinas por *S. aureus* em diferentes condições deveria conter um maior número de parâmetros que considerassem todas essas situações. Atualmente, não se observa na literatura um modelo que contenha essas características. Entretanto, o modelo de LPM, apesar de não conseguir descrever com precisão a produção de enterotoxinas, pode reproduzir de forma relativamente acurada os dados experimentais caso se tenha à disposição um número relativamente razoável de pontos experimentais, além de apresentar a vantagem de possuir uma solução analítica. A alternativa de reproduzir os resultados com modelos que envolvam a simulação do comportamento e produção de enterotoxinas por um conjunto pré-estabelecido de bactérias parece ser uma alternativa promissora e que deveria ser considerada em trabalhos futuros.



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, N. F. et al. PAMDB, A Multilocus Sequence Typing and Analysis Database and Website for Plant-Associated Microbes. **Phytopathology**, v. 100, n. 3, p. 208–215, mar. 2010. ISSN 0031-949X.
- ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751–1773, jul. 2010. ISSN 2072-6651.
- BAIRD-PARKER, A. C. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 25, n. 1, p. 12–19, abr. 1962. ISSN 00218847.
- BAIRD-PARKER, A. C.; DAVENPORT, E. The Effect of Recovery Medium on the Isolation of *Staphylococcus aureus* after Heat Treatment and after the Storage of Frozen or Dried Cells. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 28, n. 3, p. 390–402, dez. 1965. ISSN 00218847.
- BARAN, A.; ERDOGAN, A.; ADIGUZEL, C. A review on the presence of *Staphylococcus aureus* in cheese. **Turkish Journal of Nature and Science**, v. 6, 12 2017.
- BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. J. Genetic and Molecular Analyses of the Gene Encoding Staphylococcal Enterotoxin Dt. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 8, 1989.
- BENNETT, S. D. et al. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2011 Annual Report**. [S.l.], 2012. 20 p.
- BENNETT, S. D. et al. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2012 Annual Report**. [S.l.], 2013. 20 p.
- BERGDOLL, M. S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 91–99, mar. 1990. ISSN 01681605.
- BERGDOLL, M. S.; ROBBINS, R. N. Characterization of types of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 36, n. 12, p. 610–612, dez. 1973. ISSN 0022-2747.
- BETLEY, M.; MEKALANOS, J. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. **Science**, v. 229, n. 4709, p. 185–187, jul. 1985. ISSN 0036-8075, 1095-9203.
- BETLEY, M. J.; BORST, D. W.; REGASSA, L. B. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. In: **Biological Significance of Superantigens**. [S.l.]: Karger Publishers, 1992. v. 55, p. 1–35.
- BIEROWIEC, K.; PŁONECZKA-JANECZKO, K.; RYPUŁA, K. Is the colonisation of *Staphylococcus aureus* in pets associated with their close contact with owners? **PloS one**, Public Library of Science, v. 11, n. 5, p. e0156052, 2016.
- BIGELOW, W. The logarithmic nature of thermal death time curves. **The Journal of Infectious Diseases**, JSTOR, p. 528–536, 1921.
- BIGELOW, W.; ESTY, J. The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. **The Journal of Infectious Diseases**, JSTOR, p. 602–617, 1920.

- BISCHOFF, K. B. Optimal continuous fermentation reactor design. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 44, n. 5, p. 281–284, 1966.
- BORST, D. W.; BETLEY, M. J. Phage-Associated Differences in Staphylococcal Enterotoxin A Gene (sea) Expression Correlate with sea Allele Class. **Infection and immunity**, v. 62, p. 6, 1993.
- BOSE, J. L. (Ed.). **The genetic manipulation of staphylococci: methods and protocols**. [S.l.]: Humana Press : Springer, 2016. (Springer protocols, 1373). ISBN 978-1-4939-3157-6.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução - RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004**. Brasília, DF, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Brasília, DF, 2018. 16 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria de Consolidação nº 4, de 28 de Setembro de 2017**. Brasília, 2017. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- BROWN, A. F. et al. *Staphylococcus aureus* colonization: modulation of host immune response and impact on human vaccine design. **Frontiers in immunology**, Frontiers, v. 4, p. 507, 2014.
- BUCHANAN, R.; WHITING, R.; DAMERT, W. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. **Food Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 313 – 326, 1997. ISSN 0740-0020.
- BUSSCHE, R. A. V. D.; LYON, J. D.; BOHACH, G. A. Molecular evolution of the staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin gene family. **Molecular phylogenetics and evolution**, Elsevier, v. 2, n. 4, p. 281–292, 1993.
- CASTRO, A.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. *Staphylococcus aureus*, a food pathogen: virulence factors and antibiotic resistance. In: **Foodborne Diseases**. [S.l.]: Elsevier, 2018. p. 213–238.
- COUCH, J. L.; BETLEY, M. J. Nucleotide sequence of the type c3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. **Journal of bacteriology**, Am Soc Microbiol, v. 171, n. 8, p. 4507–4510, 1989.
- COUTO, I. et al. Identification of Clinical Staphylococcal Isolates from Humans by Internal Transcribed Spacer PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3099–3103, set. 2001. ISSN 0095-1137.
- CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 380–407, mar. 2012. ISSN 1574-6976.
- CUNHA, M. d. L. Ribeiro de Souza da. Methods for the Identification, Characterization, and Tracking the Spread of *Staphylococcus aureus*. In: **Staphylococcus aureus**. [S.l.]: Elsevier, 2018. p. 105–125. ISBN 978-0-12-809671-0.
- CZOP, J. K.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal enterotoxin synthesis during the exponential, transitional, and stationary growth phases. **Infection and immunity**, Am Soc Microbiol, v. 9, n. 2, p. 229–235, 1974.

- DEWEY-MATTIA, D. et al. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2013 Annual Report**. [S.l.], 2014. 20 p.
- DEWEY-MATTIA, D. et al. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2016 Annual Report**. [S.l.], 2017. 24 p.
- DEWEY-MATTIA, D. et al. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2015 Annual Report**. [S.l.], 2016. 24 p.
- DEWEY-MATTIA, D. et al. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — United States, 2009–2015**. [S.l.], 2018. v. 67, n. 10, 16 p.
- DEWEY-MATTIA, D.; MANIKONDA, K.; VIEIRA, A. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2014 Annual Report**. [S.l.], 2015. 24 p.
- DROUGKA, E. et al. Interspecies spread of *Staphylococcus aureus* clones among companion animals and human close contacts in a veterinary teaching hospital. A cross-sectional study in Greece. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 126, p. 190–198, abr. 2016. ISSN 01675877.
- EFSA; ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, v. 13, n. 1, p. 3991, jan. 2015. ISSN 18314732.
- EFSA, E. F. S. A. Assessment of the Public Health significance of meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. **EFSA Journal**, v. 7, n. 3, mar. 2009. ISSN 18314732, 18314732.
- EI-JAKEE, J. et al. Rapid Method for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins in Food. **Global Veterinaria**, p. 7, 2013.
- EIFF, C. von; BECKER, K.; SKOV, R. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and Other Catalase-Positive Cocci. In: PFALLER, M. A. et al. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition**. [S.l.]: American Society of Microbiology, 2015. p. 354–382. ISBN 978-1-55581-737-4 978-1-55581-738-1.
- ELZHOV, T. V. et al. **minpack.lm: R Interface to the Levenberg-Marquardt Nonlinear Least-Squares Algorithm Found in MINPACK, Plus Support for Bounds**. [S.l.], 2016. R package version 1.2-1. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=minpack.lm>>.
- ESTY, J.; MEYER, K. The heat resistance of the spores of *b. botulinus* and allied anaerobes. xi. **The Journal of Infectious Diseases**, JSTOR, p. 650–664, 1922.
- FERNÁNDEZ, M. M. et al. Binding of natural variants of staphylococcal superantigens SEG and SEI to TCR and MHC class II molecule. **Molecular Immunology**, v. 43, n. 7, p. 927–938, mar. 2006. ISSN 01615890.
- FETSCH, A. et al. *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. **International Journal of Food Microbiology**, p. 6, 2014.
- FETSCH, A.; JOHLER, S. *Staphylococcus aureus* as a Foodborne Pathogen. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 5, n. 2, p. 88–96, jun. 2018. ISSN 2196-5471.
- FITZGERALD, J. R. et al. Characterization of a Putative Pathogenicity Island from Bovine *Staphylococcus aureus* Encoding Multiple Superantigens. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 63–70, jan. 2001. ISSN 0021-9193.

- FUJIKAWA, H.; KAI, A.; MOROZUMI, S. A New Logistic Model for Bacterial Growth. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)**, v. 44, n. 3, p. 155–160, 2003. ISSN 0015-6426, 1882-1006.
- FUJIKAWA, H.; MOROZUMI, S. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. **Food Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 260–267, maio 2006. ISSN 07400020.
- GARNIER, A.; GAILLET, B. Analytical solution of luedeking–piret equation for a batch fermentation obeying monod growth kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 12, p. 2468–2474, 2015.
- GIBSON, A. M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T. A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type a in pasteurized pork slurry. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 62, n. 6, p. 479–490, 1987.
- GRACE, D.; FETSCH, A. *Staphylococcus aureus*—a foodborne pathogen: Epidemiology, detection, characterization, prevention, and control: An overview. In: **Staphylococcus aureus**. [S.l.]: Elsevier, 2018. p. 3–10.
- GRISPOLDI, L. et al. Characterization of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of dairy science**, Elsevier, v. 102, n. 2, p. 1059–1065, 2019.
- GRISPOLDI, L. et al. Short communication: Characterization of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. v. 102, n. 2, p. 1059–1065, fev. 2019. ISSN 00220302.
- GUNVIG, A. et al. Staphtox predictor - A dynamic mathematical model to predict formation of *Staphylococcus enterotoxin* during heating and fermentation of meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 285, p. 81–91, nov. 2018. ISSN 01681605.
- HENNEKINNE, J. A.; BUYSER, M.-L. D.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 815–836, jul. 2012. ISSN 1574-6976.
- HU, D.-L. et al. *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. In: **Staphylococcus aureus**. [S.l.]: Elsevier, 2018. p. 39–55. ISBN 978-0-12-809671-0.
- HUANG, L. Ipmp 2013 — a comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 100 – 107, 2014. ISSN 0168-1605.
- JARRAUD, S. et al. egc, A Highly Prevalent Operon of Enterotoxin Gene, Forms a Putative Nursery of Superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 1, p. 669–677, jan. 2001. ISSN 0022-1767, 1550-6606.
- JOHNS, M. B.; KHAN, S. A. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with a discrete genetic element. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 9, p. 4033–4039, set. 1988. ISSN 0021-9193, 1098-5530.
- JOZSEF, B.; TERRY, R. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 277 – 294, 1994. ISSN 0168-1605. Special Issue Predictive Modelling.

KADARIYA, J.; SMITH, T. C.; THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014. ISSN 2314-6133, 2314-6141.

KOHRERT, K. Development of a multiplex-PCR for direct detection of the genes for enterotoxin B and C, and toxic shock syndrome toxin-I in *Staphylococcus aureus* isolates. p. 6, 2019.

KURODA, M. et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v. 357, n. 9264, p. 1225–1240, abr. 2001. ISSN 01406736.

KWOK, A. Y. C. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 53, n. 1, p. 87–92, jan. 2003. ISSN 14665026, 14665034.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970. ISSN 0028-0836, 1476-4687.

LEE, Y. J. et al. Predictive model for the growth kinetics of *Staphylococcus aureus* in raw pork developed using integrated pathogen modeling program (ipmp) 2013. **Meat science**, Elsevier, v. 107, p. 20–25, 2015.

LETERTRE, C. et al. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 1, p. 38–43, jul. 2003. ISSN 1364-5072, 1365-2672.

LEUNG, Y. *Staphylococcus aureus*. In: **Encyclopedia of Toxicology**. [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 379–380. ISBN 978-0-12-386455-0.

LICITRA, G. Etymologia: *Staphylococcus* - Volume 19, Number 9—September 2013 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. set. 2013.

LINA, G. et al. Standard Nomenclature for the Superantigens Expressed by *Staphylococcus*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 12, p. 2334–2336, jun. 2004. ISSN 0022-1899, 1537-6613.

LIU, C. Editorial Commentary: A Quality-of-Care Bundle for Treatment of *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Ready for Prime Time? **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 9, p. 1234–1236, nov. 2013. ISSN 1058-4838, 1537-6591.

LIU, D. Enterotoxin-Producing *Staphylococcus aureus*. In: **Molecular Medical Microbiology**. [S.l.]: Elsevier, 2015. p. 979–995. ISBN 978-0-12-397169-2.

LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. **Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering**, v. 1, n. 4, p. 393–412, dez. 1959. ISSN 0368-1467, 1547-173X.

MARR, J. et al. Characterization of novel type c staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. **Infection and immunity**, Am Soc Microbiol, v. 61, n. 10, p. 4254–4262, 1993.

MARTIN, E.; LINA, G.; DUMITRESCU, O. *Staphylococcus aureus*. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. (Ed.). **Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)**. Second edition. Oxford: Academic Press, 2014. p. 501 – 507. ISBN 978-0-12-384733-1.

MCMEEKIN, T.; MELLEFONT, L.; ROSS, T. Predictive microbiology: past, present and future. **Modelling microorganisms in food**, Cambridge: CRC Press, Woodhouse Publishing Ltd, v. 1, p. 7–11, 2007.

MEMPEL, M. et al. High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in staphylococcus aureus isolates from patients with atopic eczema. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Springer, v. 22, n. 5, p. 306–309, 2003.

MIN, K.-J. et al. Effect of temperature on the production of staphylococcal enterotoxin and thermal inactivation kinetics of staphylococcus aureus in selected ready-to-eat (rte) foods in Korea. **Journal of Food Safety**, Wiley Online Library, v. 33, n. 1, p. 17–24, 2013.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Review of Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 371–394, 1949.

MUNSON, S. H. et al. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types g and i from staphylococcus aureus. **Infection and Immunity**, American Society for Microbiology Journals, v. 66, n. 7, p. 3337–3348, 1998. ISSN 0019-9567.

NOVICK, R. P.; CHRISTIE, G. E.; PENADÉS, J. R. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 541–551, ago. 2010. ISSN 1740-1526, 1740-1534.

OMOE, K. et al. Identification and Characterization of a New Staphylococcal Enterotoxin-Related Putative Toxin Encoded by Two Kinds of Plasmids. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 10, p. 6088–6094, out. 2003. ISSN 0019-9567.

OMOE, K. et al. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, n. 2, p. 191–198, maio 2005. ISSN 03781097, 15746968.

OMOE, K. et al. Biological Properties of Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxin Type R. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3664–3667, jun. 2004. ISSN 0019-9567.

OMOE, K. et al. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* Isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of *S. aureus* Isolates Harboring *seg*, *seh*, or *sei* Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 857–862, mar. 2002. ISSN 0095-1137.

ONO, H. et al. Development of an Immunoassay for Detection of Staphylococcal Enterotoxin-Like J, A Non-Characterized Toxin. **Toxins**, v. 10, n. 11, p. 458, nov. 2018. ISSN 2072-6651.

ORWIN, P. M. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin L. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2916–2919, maio 2003. ISSN 0019-9567.

ORWIN, P. M. et al. Biochemical and Biological Properties of Staphylococcal Enterotoxin K. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 360–366, jan. 2001. ISSN 0019-9567.

OTERO, A. et al. Production of staphylococcal enterotoxins c1 and c2 and thermonuclease throughout the growth cycle. **Appl. Environ. Microbiol.**, Am Soc Microbiol, v. 56, n. 2, p. 555–559, 1990.



- PANIZZ, P. et al. Fibrinogen Substrate Recognition by Staphylocoagulase-(Pro)thrombin Complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 2, p. 1179–1187, jan. 2006. ISSN 0021-9258, 1083-351X.
- PELEG, M. B. C. M. Reinterpretation of microbial survival curves. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Taylor & Francis, v. 38, n. 5, p. 353–380, 1998. PMID: 9704188.
- PELZ, A. et al. Structure and Biosynthesis of Staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 37, p. 32493–32498, set. 2005. ISSN 0021-9258, 1083-351X.
- PETINAKI, E.; SPILIOPOULOU, I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among companion and food-chain animals: impact of human contacts. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 7, p. 626–634, jul. 2012. ISSN 1198743X.
- PFALLER, M. A. et al. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition**. [S.l.]: American Society of Microbiology, 2015. ISBN 978-1-55581-737-4 978-1-55581-738-1.
- R Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.
- REN, K. et al. Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 5, p. 1675–1683, nov. 1994. ISSN 0022-1007.
- ROLA, J. G. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci isolated from raw goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 123, n. 1, p. 124–128, jan. 2015. ISSN 09214488.
- ROSS, T.; DALGAARD, P.; TIENUNGOON, S. Predictive modelling of the growth and survival of listeria in fishery products. **International journal of food microbiology**, Elsevier, v. 62, n. 3, p. 231–245, 2000.
- ROSS, T.; MCMEEKIN, T. Predictive microbiology. **International journal of food microbiology**, Elsevier, v. 23, n. 3-4, p. 241–264, 1994.
- RStudio Team. **RStudio: Integrated Development Environment for R**. Boston, MA, 2018. Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>.
- SABIKE, I. et al. Production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin a in raw milk at high temperatures. **Journal of food protection**, International Association for Food Protection, v. 77, n. 9, p. 1612–1616, 2014.
- SAKAI, F. et al. Characteristics of enterotoxin h–producing *Staphylococcus aureus* isolated from clinical cases and properties of the enterotoxin productivity. **Journal of food protection**, International Association for Food Protection, v. 71, n. 9, p. 1855–1860, 2008.
- SCHELIN, J. et al. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 580–592, nov. 2011. ISSN 2150-5594, 2150-5608.
- SHEPHEARD, M. A. et al. Historical Zoonoses and Other Changes in Host Tropism of *Staphylococcus aureus*, Identified by Phylogenetic Analysis of a Population Dataset. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e62369, maio 2013. ISSN 1932-6203.

- SU, Y. C.; WONG, A. C. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, h. **Applied and Environmental Microbiology**, American Society for Microbiology Journals, v. 61, n. 4, p. 1438–1443, 1995. ISSN 0099-2240.
- SUMBY, P.; WALDOR, M. K. Transcription of the toxin genes present within the staphylococcal phage  $\varphi$ sa3ms is intimately linked with the phage's life cycle. **Journal of bacteriology**, Am Soc Microbiol, v. 185, n. 23, p. 6841–6851, 2003.
- TANGO, C. N. et al. Growth of *Staphylococcus aureus* in cooked ready-to-eat ground fish as affected by inoculum size and potassium sorbate as food preservative. **LWT-Food Science and Technology**, Elsevier, v. 71, p. 400–408, 2016.
- THOMAS, D. Y. et al. Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxins U2 and V, Two New Staphylococcal Superantigens Arising from Recombination within the Enterotoxin Gene Cluster. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 8, p. 4724–4734, ago. 2006. ISSN 0019-9567.
- TODD, E. Bacteria: *Staphylococcus aureus*. In: **Encyclopedia of Food Safety**. [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 530–534. ISBN 978-0-12-378613-5.
- TSUTSUURA, S.; SHIMAMURA, Y.; MURATA, M. Temperature dependence of the production of staphylococcal enterotoxin a by *Staphylococcus aureus*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, p. 120391, 2013.
- VALIHRACH, L.; ALIBAYOV, B.; DEMNEROVA, K. Production of staphylococcal enterotoxin C in milk. **International Dairy Journal**, v. 30, n. 2, p. 103–107, jun. 2013. ISSN 09586946.
- WHITING, R. C. A classification of models in predictive microbiology - a reply to k. r. davey. **Food Microbiol.**, v. 10, p. 175–177, 1993.
- WILSON, G. J. et al. A Novel Core Genome-Encoded Superantigen Contributes to Lethality of Community-Associated MRSA Necrotizing Pneumonia. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 10, p. e1002271, out. 2011. ISSN 1553-7374.
- ZHANG, S.; IANDOLO, J. J.; STEWART, G. C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant ( *sej* ). **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, n. 2, p. 227–233, nov. 1998. ISSN 03781097, 15746968.

## **Apêndices**



## APÊNDICE A – RESULTADOS OBTIDOS COM O MODELO LPM

Tabela 17 – Resultados da primeira regressão.

Referência	$a_1$	$a_2$	$X_{max}$
<b>Fujikawa et al. (2006)</b>			
a	9,14±1,11	-0,78±2,78e-01	7,9396±1,10e-03
b	19,5±4,77	-3,54±2,53	8.4603±1,51e-01
<b>Min et al. (2013)</b>			
2a	118,48±3,44e+01	1,06±2,73e+01	7,8711±1,00e-04
2b	86,56±4,19e+01	0,31±2,11e+01	8,0938±2,00e-04
2c	28,97±2,57e+01	-4,94±1,97e+01	8,0175±2,42
2d	-50,08±2,51e+02	-16841,56±7,54e+06	852,0134±3,77e+05
1a	103,96±2,09e+02	0,71±1,24e+02	6,9944±1,00e-04
1b	11,08±2,19e+01	-26±3,23e+01	9,2217±1,56
1c	2,54±5,12e+01	-38,52±1,64e+02	10,4256±1,27e+01
1d	6,02±2,46	-5,25±1,98	7,8666±1,08e-01
1e	5,89±5,92	-4,45±3,38	8,0905±9,64e-02
<b>Tsutsuura et al. (2013)</b>			
1a	4,69±4,41	0,27±3,06	8,4506±0,00
1b	8,97±1,21e+01	4,23±2,78e+01	9,6393±1,20e+01
1c	-8,97±2,31e+01	-66,05±1,04e+02	13,2165±6,44
1d	-1,36±6,10	-11,04±1,33e+01	10,6984±2,35
2a	41,88±7,06e+01	0,38±4,37	7,4314±1,00e-04
2b	343,07±2,56e+03	11605,3±3,23e+06	281,5174±7,41e+04
2c	-16,29±2,94e+01	-13,91±7,02	9,9646±6,14e-02
2d	4,27±4,01	-2,29±7,82e-01	9,8484±8,00e-04
3a	283,09±1,02e+04	1877,05±6,10e+05	53,8413±1,35e+04
3b	536,78±8,28e+03	1227,15±8,29e+04	24,1873±8,74e+02
3c	75,95±4,54e+02	20,5±3,14e+02	9,1665±1,65e+01
<b>Czop et al. (1974)</b>			
1 (SEB)	7,17±7,42e-01	-1,29±4,82e-01	9,441±2,05e-02
4 (SEA)	7,52±9,34e-01	-1,83±4,52e-01	10,3566±1,85e-02
4 (SEB)	7,32±8,61e-01	-1,93±4,82e-01	10,3437±2,58e-02
5 (SEA)	256,59±2,56e+03	1409,8±1,73e+05	67,9759±6,54e+03
<b>Otero et al. (1990)</b>			
1 (SEC)	2,49±9,04e-01	-5,68±1,44	10,9344±2,67e-01
2 (SEC2)	1,47±4,90e-01	-4,65±4,84e-01	10,9244±3,86e-02
3 (SEC2)	1,82±9,29e-01	-3,9±8,72e-01	10,4045±6,74e-02

4 (SEC1)	2,88±8,33e-01	-4,32±9,46e-01	10,5583±1,19e-01
<b>Sakai et al. (2008)</b>			
3a (SEB)	7,6±6,31e-01	-1,16±3,38e-01	9,5401±0,00
3a (SEH)	7,6±6,31e-01	-1,16±3,38e-01	9,5401±0,00
3b (SEB)	7,01±1,25	-0,95±5,29e-01	9,644±0,00
3b (SEH)	7,01±1,25	-0,95±5,29e-01	9,644±0,00
<b>Sabike et al. (2014)</b>			
1a (Círculo)	859,59±2,68e+04	667,46±5,35e+04	11,5497±2,35e+02
2a (Quadrado)	-756,77±1,28e+03	5,52±7,15e+01	7,0249±0,00
2a (Triângulo)	1036,98±4,28e+03	1295,39±1,73e+04	14,662±7,37e+01
2b (Quadrado)	2069,17±5,23e+03	5040,44±5,68e+04	21,4255±1,32e+02
2b (Círculo)	-289,2±7,56e+03	4,11±4,73e+02	7,0249±1,70e-03
2b (Triângulo)	-402,33±1,55e+03	23,01±1,26e+02	6,7502±4,34e-01
<b>Valihrach et al. (2013)</b>			
<b>SA1178</b>			
Losango	-2147,78±6,87e+04	-2984,16±2,50e+05	16,3564±4,89e+02
Quadrado	4044,37±2,95e+04	7624±2,23e+05	20,9097±2,96e+02
Triângulo	-718,24±2,60e+05	-11679,27±2,52e+07	60,292±1,06e+05
<b>SA1189</b>			
Losango	31,08±8,89e+01	-11,59±1,17e+01	8,9275±1,00e-04
Quadrado	-2029,54±1,07e+05	75,53±3,37e+04	5,6236±1,57e-01
Triângulo	1404,07±3,27e+05	6951,06±2,43e+07	53,4421±1,48e+05
<b>SA1612</b>			
Losango	-150,96±4,61e+01	-59,92±1,02e+01	8,8211±2,47e-02
Quadrado	713,11±6,26e+02	61,27±1,26e+02	8,6106±2,75e-01
Triângulo	2861,67±1,11e+05	773,9±6,51e+04	6,9567±6,33e+01
<b>SA720</b>			
Losango	50,75±1,78e+02	-8,49±2,69e+01	8,9865±0,00
Quadrado	5144,17±3,86e+04	6831,17±1,60e+05	16,6092±1,49e+02
Triângulo	613,69±1,84e+04	2,63±6,42e+03	7,2466±4,08e-02
<b>SA817</b>			
Losango	244,64±4,92e+02	7,65±8,53e+01	9,005±5,07e-01
Quadrado	3656,76±3,48e+04	4725,01±1,45e+05	16,5194±1,92e+02
Triângulo	-4168,24±3,86e+05	2105,25±2,58e+05	3,5478±1,14e+02

Tabela 18 – Resultados da segunda regressão.

Referência	$b_1$	$b_2$	$P_0$
<b>Fujikawa et al. (2006)</b>			
a	$-0,1 \pm 1,1e-01$	$-0,65 \pm 7,6e-02$	$-0,09 \pm 2,2e-01$
b	$-0,41 \pm 1,1e-01$	$-1,76 \pm 1,7e-01$	$-0,03 \pm 1,6e-01$
<b>Min et al. (2013)</b>			
2a	$-0,02 \pm 3,6e-02$	$0,02 \pm 1,0e-02$	$0,07 \pm 5,0e-02$
2b	$-0,08 \pm 5,4e-02$	$0 \pm 1,8e-02$	$0,33 \pm 1,1e-01$
2c	$-0,03 \pm 3,4e-02$	$-0,09 \pm 6,4e-02$	$-0,08 \pm 2,5e-02$
2d	$-5,73 \pm 1,9e+01$	$-4875,21 \pm 1,6e+04$	$-0,08 \pm 5,0e-02$
1a	$0,02 \pm 4,3e-02$	$0 \pm 9,0e-03$	$0,35 \pm 1,2e-01$
1b	$-0,2 \pm 9,4e-02$	$-1,05 \pm 2,9e-01$	$0 \pm 1,1e-01$
1c	$-0,64 \pm 5,0e-01$	$-3,97 \pm 2,4$	$-0,12 \pm 2,8e-01$
1d	$-0,09 \pm 3,7e-02$	$-0,43 \pm 5,5e-02$	$0,1 \pm 7,1e-02$
1e	$-0,11 \pm 1,3e-01$	$-0,48 \pm 1,9e-01$	$0,05 \pm 2,7e-01$
<b>Tsutsuura et al. (2013)</b>			
1a	$0,9 \pm 6,1e-01$	$0,31 \pm 2,2e-01$	$-0,43 \pm 2,6$
1b	$1,38 \pm 1,7$	$2,93 \pm 6,0$	$-0,39 \pm 2,6$
1c	$-14,11 \pm 8,8$	$-115,65 \pm 5,6e+01$	$2,6 \pm 1,0e+01$
1d	$-0,47 \pm 1,4e+01$	$-80,91 \pm 5,0e+01$	$-17,34 \pm 2,4e+01$
2a	$2,41 \pm 2,4$	$0,34 \pm 2,5e-01$	$2,3 \pm 1,8$
2b	$971,86 \pm 1,2e+03$	$265552,16 \pm 3,2e+05$	$3,14 \pm 6,9$
2c	$3,88 \pm 1,2e+01$	$-16,61 \pm 1,1e+01$	$-7,27 \pm 1,7e+01$
2d	$31,49 \pm 6,9$	$-2,93 \pm 3,5$	$-26,71 \pm 1,6e+01$
3a	$-69,59 \pm 2,2e+02$	$-3097,84 \pm 1,0e+04$	$9,48 \pm 3,4$
3b	$187,22 \pm 1,1e+02$	$3140,32 \pm 1,9e+03$	$0,42 \pm 3,2$
3c	$3,13 \pm 6,7$	$8,39 \pm 1,4e+01$	$2,22 \pm 1,6$
<b>Czop et al. (1974)</b>			
1 (SEB)	$-3,58 \pm 1,8$	$-33,42 \pm 2,7$	$-3,63 \pm 6,1$
4 (SEA)	$21,9 \pm 6,0$	$-14,07 \pm 6,7$	$-53,53 \pm 2,2e+01$
4 (SEB)	$-10,18 \pm 2,6$	$-38,25 \pm 2,9$	$7,36 \pm 9,8$
5 (SEA)	$-158,02 \pm 4,2e+01$	$-9521,11 \pm 2,5e+03$	$0,66 \pm 9,8e-01$
<b>Otero et al. (1990)</b>			
1 (SEC)	$-2,36 \pm 6,3e-01$	$-10,87 \pm 1,8$	$1,76 \pm 1,8$
2 (SEC2)	$-2,57 \pm 3,5e-01$	$-10,51 \pm 7,5e-01$	$2,57 \pm 1,3$
3 (SEC2)	$-0,35 \pm 1,1e-01$	$-0,91 \pm 2,2e-01$	$0,36 \pm 3,7e-01$
4 (SEC1)	$-0,3 \pm 8,3e-02$	$-1,27 \pm 2,0e-01$	$0,21 \pm 2,5e-01$

**Sakai et al. (2008)**

3a (SEB)	-0,01±4,4e-02	-0,27±2,5e-02	-0,07±1,4e-01
3a (SEH)	0,09±1,6e-01	-0,41±9,0e-02	-0,27±5,1e-01
3b (SEB)	-0,53±7,7e-02	-1,25±3,9e-02	0,29±2,8e-01
3b (SEH)	0,05±2,8e-02	-0,04±1,4e-02	-0,06±1,0e-01

**Sabike et al. (2014)**

1a (Círculo)	27,47±5,0e+01	102,96±2,6e+02	-0,04±6,0
2a (Quadrado)	-0,17±7,6e-01	0,04±3,5e-02	0±3,2e-01
2a (Triângulo)	17,88±6,6e+01	81,21±5,4e+02	-0,04±8,2
2b (Quadrado)	44,03±1,5e+02	542,38±2,2e+03	2,93±5,4
2b (Círculo)	0,08±3,6e-01	0±1,7e-02	0±9,7e-02
2b (Triângulo)	-0,19±7,0e-01	0,14±2,1e-01	0,28±1,9e-01

**Valihrach et al. (2013)****SA1178**

Losango	2,95±1,3	19,47±1,1e+01	0±1,1e-01
Quadrado	19,51±2,4	254,61±3,2e+01	0,01±1,7e-01
Triângulo	-82,45±4,4e+01	-4452,68±2,4e+03	0,65±1,8e-01

**SA1189**

Losango	0,5±1,3e-01	-0,08±3,4e-02	-0,03±2,8e-01
Quadrado	-1,34±4,0e-01	0,52±9,3e-02	0±1,5e-01
Triângulo	-63,57±4,1e+01	-2976,92±1,9e+03	0,8±2,9e-01

**SA1612**

Losango	0,82±9,6e-02	-0,01±7,5e-02	0,02±1,0e-01
Quadrado	1,69±1,9e-01	0,57±1,4e-01	0±2,0e-01
Triângulo	5±1,2	8,05±1,8	0,59±1,1e-01

**SA720**

Losango	0,74±1,0e-01	-0,01±2,2e-02	0,03±2,6e-01
Quadrado	13,37±1,2	115,83±1,1e+01	0±8,7e-02
Triângulo	-1,52±1,8	-0,22±2,4e-01	1,06±4,6e-01

**SA817**

Losango	0,83±1,8e-01	0,01±1,2e-01	-0,01±2,9e-01
Quadrado	6,44±2,6	53,71±2,4e+01	0±2,7e-01
Triângulo	-5,25±4,1	16,5±1,2e+01	-0,01±2,0e-01



Tabela 19 – Resultados dos parâmetros obtidos pelas regressões e notas das curvas analisadas.

Figura	$u_{max}$	$K_s \cdot Y_{x/s}$	$\alpha$	$\beta$	Nota de SA	Nota de SE
<b>Fujikawa et al. (2006)</b>						
a	0,1196	0,7439	-0,9760	0,1053	4	4
b	0,0627	1,8789	-1,3439	0,0587	4	4
<b>Min et al. (2013)</b>						
2a	0,0084	-0,0698	-0,2972	0,0023	3	1
2b	0,0115	-0,0292	-0,0717	0,0000	3	1
2c	0,0416	1,6468	-0,0857	0,0023	3	1
2d	-0,0001	-849,4876	0,0089	0,0003	3	1
1a	0,0096	-0,0473	-0,0188	0,0003	2	1
1b	-0,0670	-16,0724	-0,1321	0,0044	3	3
1c	-0,0278	-11,1630	-0,2839	0,0099	3	3
1d	1,2995	53,6770	-0,0970	0,0103	4	3
1e	0,6957	25,0558	-0,1269	0,0134	4	2
<b>Tsutsuura et al. (2013)</b>						
1a	0,2019	-0,4524	0,2192	0,1379	1	3
1b	0,0758	-3,0874	0,4353	0,0718	1	3
1c	-0,0133	-11,6357	-4,1664	0,1325	2	2
1d	-0,0807	-9,5267	8,0213	0,6850	2	3
2a	0,0237	-0,0674	-2,6762	0,1203	1	3
2b	0,0001	-273,4343	0,6841	0,0813	1	3
2c	-0,0331	-4,5894	7,5017	0,1199	2	3
2d	0,5044	11,3709	31,2277	0,1298	3	4
3a	0,0005	-46,7854	-3,3736	-0,0307	1	2
3b	0,0006	-16,8268	0,5986	0,1058	1	2
3c	0,0104	-1,9482	-1,1724	0,0446	1	2
<b>Czop et al. (1974)</b>						
1 (SEB)	0,1699	2,0655	-19,7598	2,7492	3	4
4 (SEA)	0,1757	3,3261	17,6728	0,7430	3	3
4 (SEB)	0,1855	3,7093	-20,4964	1,9132	3	4
5 (SEA)	0,0006	-57,5089	7,5366	-0,0994	3	3
<b>Otero et al. (1990)</b>						
1 (SEC)	-0,3133	-19,4534	-1,7978	0,1750	3	4
2 (SEC2)	-0,3142	-15,9547	-1,9146	0,2070	3	4
3 (SEC2)	-0,4798	-19,4799	-0,2992	0,0224	3	2
4 (SEC1)	-0,6941	-31,6660	-0,2575	0,0277	4	4

**Sakai et al. (2008)**

3a (SEB)	0,1553	1,7245	-0,1654	0,0243	3	3
3a (SEH)	0,1553	1,7245	-0,1511	0,0374	3	3
3b (SEB)	0,1649	1,5148	-1,3536	0,1363	3	3
3b (SEH)	0,1649	1,5148	0,0184	0,0046	3	3

**Sabike et al. (2014)**

1a (Círculo)	0,0007	-5,0483	7,0704	0,0134	2	2
2a (Quadrado)	-0,0013	0,0516	0,5781	0,0010	2	2
2a (Triângulo)	0,0004	-8,1432	7,9097	0,0043	2	2
2b (Quadrado)	0,0001	-15,1898	8,3223	0,0050	2	2
2b (Círculo)	-0,0035	0,1014	0,1067	0,0001	2	2
2b (Triângulo)	-0,0026	0,4094	0,1526	0,0009	1	2

**Valihrach et al. (2013)****SA1178**

Losango	-0,0002	-9,5111	0,9067	-0,0004	2	2
Quadrado	0,0001	-13,6622	0,8766	0,0016	2	3
Triângulo	-0,0001	-56,7990	-4,0577	0,0063	1	1

**SA1189**

Losango	0,0513	5,3095	0,4886	0,0007	3	3
Quadrado	-0,0005	0,2174	1,0437	0,0012	1	3
Triângulo	0,0001	-44,4612	3,3864	-0,0080	1	1

**SA1612**

Losango	-0,0047	-2,5065	0,8212	0,0000	3	3
Quadrado	0,0013	-0,6812	0,8558	0,0011	1	3
Triângulo	0,0003	-1,4809	-0,4405	0,0015	1	1

**SA720**

Losango	0,0237	1,8042	0,7368	0,0002	2	2
Quadrado	0,0001	-9,4745	1,1430	0,0010	2	2
Triângulo	0,0016	-0,0309	5,5452	-0,0115	1	2

**SA817**

Losango	0,0040	-0,2729	0,7742	0,0002	3	3
Quadrado	0,0001	-9,3124	0,6742	0,0007	2	2
Triângulo	-0,0005	3,6204	-0,6868	0,0022	2	1