

JORGE LUIZ FORTUNA

**ASPECTOS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS NO PREPARO DE
CARNE BOVINA SERVIDA NAS REFEIÇÕES ESCOLARES
(MERENDA ESCOLAR) EM INSTITUIÇÕES MUNICIPAIS E
ESTADUAIS DE ENSINO NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**



Tese apresentada ao Curso de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de Concentração em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Prof. M.S. **ROBSON MAIA FRANCO**

Niterói - RJ
2000

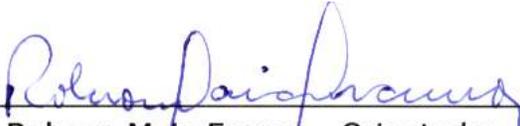
JORGE LUIZ FORTUNA

**ASPECTOS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS NO PREPARO DE CARNE BOVINA
SERVIDA NAS REFEIÇÕES ESCOLARES (MERENDA ESCOLAR) EM
INSTITUIÇÕES MUNICIPAIS E ESTADUAIS DE ENSINO NO ESTADO DO
RIO DE JANEIRO.**

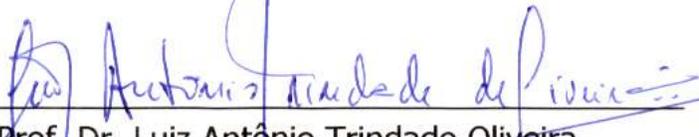
Tese apresentada ao Curso de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de Concentração em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovado em 31 de maio de 2000.

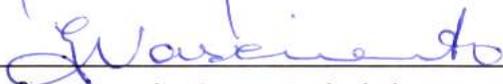
BANCA EXAMINADORA



Prof. M.S. Robson Maia Franco - Orientador
Universidade Federal Fluminense / MTA



Prof. Dr. Luiz Antônio Trindade Oliveira
Universidade Federal Fluminense / MTA



Prof.^a. Dr.^a. Maria da Graça Fichel do Nascimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / EMBRAPA

Niterói – RJ
2000

*Tudo que sou,
Tudo que tenho,
Tudo que sei,
Devo a vocês, meus pais.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso pai Oxalá e a todos os Orixás e Guias benfeitores, pela proteção e iluminação em todos os momentos, pois sem as Suas forças, nada seria possível.

A Érica Costa Rodrigues, pela paciência, compreensão e incentivo dedicado.

Aos meus amigos Vinicius Cunha Barcellos, Flávio Honório, Alfredo Pinheiro, Marcello Campos Valverde e Jorge André Gameiro; que a amizade seja eterna.

Ao meu orientador, Prof. Robson Maia Franco, pela experiência, dedicação e paciência.

Aos professores Luiz Antônio Trindade Oliveira e José Carlos Albuquerque do Prado Carvalho, pela ajuda e pelos conselhos durante a realização deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do Instituto Jorge Vaitsman, Hedilamar, Cleônio, Veruska, Isabel, Patrícia e Andréa, pelos primeiros passos, por mim dado, no apaixonante mundo da microbiologia.

Ao secretário de Agricultura do município de Tanguá-RJ, Sr. Cesário Paulo Honório de Oliveira, pela oportunidade.

Ao secretário de Educação do município de Tanguá-RJ, Sr. Edésio Soares da Costa, pela confiança.

Aos diretores, funcionários e merendeiras dos colégios e escolas descritos neste trabalho, dos quais sem as suas contribuições não seria possível ser realizado.

A todos os colegas e amigos, que direta e/ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que lutam por um Mundo mais justo e digno, em que possamos viver, independente de religião, crença, raça, sexo, nível sócio-econômico, ou qualquer outra forma de discriminação.

PERFEIÇÃO

(Dado Villa-Lobos – Renato Russo – Marcelo Bonfá)
- LEGIÃO URBANA -

Vamos celebrar a estupidez humana
A estupidez de todas as nações
O meu país e sua corja de assassinos
Covardes, estupradores e ladrões
Vamos celebrar a estupidez do povo
Nossa polícia e televisão
Vamos celebrar nosso governo
E nosso estado, que não é nação
Celebrar a juventude sem escola
As crianças mortas
Celebrar nossa desunião
Vamos celebrar Eros e Thanatos
Persephone e Hades
Vamos celebrar nossa tristeza
Vamos celebrar nossa vaidade.

Vamos comemorar como idiotas
A cada fevereiro e feriado
Todos os mortos nas estradas
Os mortos por falta de hospitais
Vamos celebrar nossa justiça
A ganância e a difamação
Vamos celebrar os preconceitos
O voto dos analfabetos
Comemorar a água podre
E todos os impostos
Queimadas, mentiras e seqüestros
Nosso castelo de cartas marcadas
O trabalho escravo
Nosso pequeno universo
Toda hipocrisia e toda afetação
Todo roubo e toda a indiferença
Vamos celebrar epidemias:
É a festa da torcida campeã.

Vamos celebrar a fome
Não ter a quem ouvir
Não se ter a quem amar
Vamos alimentar o que é maldade

Vamos machucar um coração
Vamos celebrar nossa bandeira
Nosso passado de absurdos gloriosos
Tudo o que é gratuito e feio
Tudo o que é normal
Vamos cantar juntos o Hino Nacional
(A lágrima é verdadeira)
Vamos celebrar nossa saudade
E comemorar a nossa solidão.

Vamos festejar a inveja
A intolerância e a incompreensão
Vamos festejar a violência
E esquecer a nossa gente
Que trabalhou honestamente a vida
inteira
E agora não tem mais direito a nada

Vamos celebrar a aberração
De toda a nossa falta de bom senso
Nosso descaso por educação
Vamos celebrar o horror
De tudo isso – com festa velório e
caixão
Está tudo morto enterrado agora
Já que também podemos celebrar
A estupidez de quem cantou esta
canção.

Venha, meu coração está com pressa
Quando a esperança está dispersa
Só a verdade me liberta
Chega de maldade e ilusão.
Venha, o amor tem sempre a porta
aberta
E vem chegando a primavera
Nosso futuro recomeça:
Venha, que o que vem é perfeição.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE GRÁFICOS.....	15
LISTA DE FIGURAS.....	16
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	20
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (D.T.A.).....	25
2.2 TOXINFECÇÕES ALIMENTARES.....	28
2.3 CARACTERÍSTICAS DOS AGENTES PESQUISADOS.....	32
2.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>.....	32
2.3.2 <i>Clostridium perfringens</i>.....	36
2.3.3 Coliformes fecais (<i>Escherichia coli</i>).....	39

2.4 QUADRO CLÍNICO CAUSADO PELOS AGENTES DAS TOXINFECÇÕES.....	42
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	42
2.4.2 <i>Clostridium perfringens</i>	44
2.4.3 <i>Escherichia coli</i>	46
2.5 EPIDEMIOLOGIA.....	48
2.6 IMPORTÂNCIA DA HIGIENIZAÇÃO.....	57
2.7 FATORES QUE INFLUENCIAM A CONTAMINAÇÃO BACTERIANA.....	61
2.8 CONDIÇÕES NECESSÁRIAS PARA A TOXINFECÇÃO ALIMENTAR.....	68
2.8.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	70
2.8.2 <i>Clostridium perfringens</i>	70
2.8.3 <i>Escherichia coli</i>	72
2.9 PREVENÇÃO DAS TOXINFECÇÕES ALIMENTARES.....	73
2.9.1 Sanificação - Uso de sanificantes	85
2.10 PADRÕES MICROBIOLÓGICOS.....	89
3 MATERIAL E MÉTODOS	90

3.1 MÉTODO DE COLETA DE AMOSTRAS.....	90
3.1.1 Amostras de carne antes e após a cocção.....	91
3.1.2 Amostras de superfícies.....	92
3.1.3 Amostras de água de abastecimento.....	92
3.2 ANÁLISES LABORATORIAIS.....	93
3.2.1 Enumeração de coliformes fecais pelo método do Número Mais Provável (NMP) e identificação de <i>Escherichia coli</i>.....	94
3.2.1.1 Identificação bioquímica.....	95
3.2.1.1.1 <i>Teste do Indol</i>	95
3.2.1.1.2 <i>Teste de Voges-Proskauer (VP) & Vermelho de Metila (VM)</i>	96
3.2.1.1.3 <i>Citrato de Simmons</i>	96
3.2.1.2 Coloração pelo método de Gram.....	97
3.2.1.3 Testes de produção de gás a partir da Glicose, H_2S , Urease e Triptofano Desaminase (Meio EPM).....	97
3.2.1.4 Testes de Motilidade, Indol e Lisina (Meio MILi).....	99
3.2.2 Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>.....	100

3.2.2.1 Testes adicionais.....	101
3.2.2.1.1 <i>Coloração pelo método de Gram</i>	102
3.2.2.1.2 <i>Catalase</i>	102
3.2.2.1.3 <i>DNAse</i>	103
3.2.2.1.4 <i>Oxidação e fermentação de glicose e manitol</i>	103
3.2.2.1.5 <i>Termonuclease</i>	104
3.2.2.1.6 <i>Teste de Voges-Proskauer (VP)</i>	104
3.2.3 Contagem de <i>Clostridium perfringens</i>	105
3.2.3.1 Testes confirmativos.....	107
3.2.3.1.1 <i>Teste de fermentação da lactose e hidrólise da gelatina</i>	107
3.2.3.1.2 <i>Teste de coagulação tempestuosa do leite</i>	108
3.2.3.1.3 <i>Teste de redução do nitrato e de motilidade</i>	108
3.2.3.1.4 <i>Teste de fermentação da rafinose e salicina</i>	109
3.2.4 Análise da água de abastecimento	110
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	111
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	113

6 CONCLUSÕES.....	119
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
ANEXOS.....	132
APÊNDICE.....	138

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Incidência de surtos e casos de doenças transmitidas por alimentos, por <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , relatados pelo serviço de inspeção de alimentos na Holanda, no período de 1991 a 1994.....	132
TABELA 2	Percentagem de <i>C. perfringens</i> e <i>S. aureus</i> isolados de carne crua, carne cozida, mãos de manipuladores e equipamentos.....	132
TABELA 3	Resultados microbiológicos, em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g), encontrados em carne antes e após a cocção.....	133
TABELA 4	Percentagem dos principais fatores que contribuem para a contaminação alimentar, sobrevivência e crescimento microbiano que favorecem com as Doenças Transmitidas por Alimentos (D.T.A).....	133
TABELA 5	Incidência das principais formas de conduta nos estágios da preparação do alimento.....	134

TABELA 6	Causas ou fatores que com maior frequência determinam a presença de casos e surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (D.T.A).....	135
TABELA 7	Pontos Críticos e Pontos Críticos de Controle (PCC) identificados em pratos protéicos.....	136
TABELA 8	Critérios e limites de Coliformes Fecais, Clostrídios Sulfitos Redutores e <i>Staphylococcus aureus</i> , para produtos cárneos.....	137
TABELA 9	Identificação das amostras com seus respectivos locais de coleta e data, assim como seu respectivo cardápio oferecido na merenda escolar.....	138
TABELA 10	Resultado da determinação do Número Mais Provável (NMP/g) de Coliformes Fecais das amostras de carne crua (CR), carne cozida (CZ), <i>swab</i> de mãos (SM) e <i>swab</i> de utensílio (SU).....	139
TABELA 11	Resultados da determinação do Número Mais Provável (NMP/mL) de Coliformes Totais e Fecais de amostras de água de abastecimento das instituições de ensino que foram analisadas.....	140

TABELA 12 Relação das amostras onde ocorreram Número Mais Provável (NMP/g) de Coliformes Fecais com a percentagem de UFC identificadas bioquimicamente como <i>Escherichia coli</i>	141
--	-----

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1** Relação das amostras contaminadas com Coliformes Fecais, usando a técnica do Número Mais Provável (NMP/g) e percentagem de UFC identificadas como *Escherichia coli*..... 142
- GRÁFICO 2** Percentagem dos resultados da identificação bioquímica de *Escherichia coli*, sugerindo 56,72% de *Escherichia coli* positivas versus 43,28% de outras *Enterobacteriaceae*..... 143
- GRÁFICO 3** Percentagem dos resultados da identificação bioquímica de *Staphylococcus*, sugerindo 38,26% de *Staphylococcus* positivas, versus 61,74% que não foram identificadas como tais..... 144
- GRÁFICO 4** Percentagem das interpretações e conclusões das análises microbiológicas das amostras de carne crua analisadas, em relação ao Número Mais Provável (NMP/g) de Coliformes Fecais..... 145
- GRÁFICO 5** Coeficiente de correlação entre amostras de carne crua e carne cozida..... 146

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Placa de Agar Azul de Toluidina (TBD) para a prova de termonuclease, apresentando ao centro prova positiva (cepa padrão de *S. aureus*, *American Type Culture Collection* (ATCC) 25923) e em torno, cultivos negativos para esta prova..... 147
- FIGURA 2** Prova de DNase positiva (cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923) caracterizada pela presença de um halo rosa claro em torno da estria..... 147
- FIGURA 3** Tubos com meio Oxidação e Fermentação (O/F) *Hugh-Leifson*, com interpretação da prova via oxidativa ou fermentativa. Resultados negativos (verdes) e positivos (amarelos) para oxidação e fermentação de carboidratos..... 148
- FIGURA 4** Tubos apresentando resultados positivos e negativos, respectivamente, para a prova de *Voges-Proskauer* (VP)..... 148

- FIGURA 5** Cepas padrões usadas para comparação das características morfológicas das cepas em meios seletivos/indicadores e provas bioquímicas..... 149
- FIGURA 6** Tubos contendo Caldo Triptona a 1%. Formação de halo vermelho na superfície do meio (positivo), devido a reação do triptofano formando o indol (produção de enzima triptofanase). As cepas de *E. coli* são indol positivo ou negativo..... 149
- FIGURA 7** Tubos positivos e negativos, respectivamente, para o teste de *Voges-Proskauer* (VP). As cepas características de *E. coli* são VP negativas..... 150
- FIGURA 8** Tubos positivos e negativos, respectivamente, para o teste do Vermelho de Metila (VM). As cepas de *E. coli* são VM positivas..... 150
- FIGURA 9** Tubos contendo Agar Citrato de Simmons inclinado. Viragem para cor azul (positivo), devido a produção de citratase que desdobra o citrato e amônia. As cepas de *E. coli* são citrato negativo..... 151

- FIGURA 10** Meio EPM para identificação de enterobactérias. Para o gênero *Escherichia*, a superfície torna-se azul ou amarela e a base amarela. Não ocorre produção de H_2S e produção de gás pode ser positiva ou negativa..... 151
- FIGURA 11** Meio MILi, para identificação de enterobactérias, que informa quanto aos testes de motilidade, produção de indol e lisina descarboxilase. As cepas do gênero *Escherichia* são motilidade positiva; indol positivo ou negativo e lisina positiva..... 152

RESUMO

As condições higiênico-sanitárias dos alimentos preparados em cozinhas de instituições de ensino, são baseadas em fatores importantes como, processo de produção deste alimento, técnica de preparo, higiene das mãos dos manipuladores e dos utensílios, temperatura e tempo de cozimento e também de produção, distribuição e estocagem deste alimento. Estes fatores interferem diretamente sobre a microbiota contaminante existente no alimento que está sendo preparado. Este trabalho teve como objetivo avaliar as condições higiênico-sanitárias na preparação de carne bovina servida em refeições escolares (merenda escolar) em instituições municipais e estaduais de ensino, através da contagem de *Staphylococcus aureus*, Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Fecais e contagem de *Clostridium perfringens*, e investigar as condições higiênico-sanitárias dos manipuladores de alimentos e de utensílios da cozinha, usando-se *swabs* para a coleta de espécimes para as análises microbiológicas supra-citadas. Também foram avaliadas as condições higiênico-sanitárias da água de abastecimento destas instituições de ensino. Foram analisadas 22 amostras de carne bovina, servida na merenda escolar de escolas municipais e estaduais, antes e após cocção; e *swabs* usados nas mãos e faca de corte de carne antes do seu uso, respectivamente, em cada coleta. Foram coletadas também, amostras de água no interior das cozinhas. Os métodos empregados foram baseados nos recomendados pela Associação Americana de Saúde Pública (*American Public Health Association* – APHA). As técnicas microbiológicas utilizadas na pesquisa permitiram avaliar diferentes características associadas à microbiota presente na carne crua, carne cozida, mãos de manipuladores e utensílios. Das 88 amostras subdivididas em carne crua; carne cozida; *swab* de mão e utensílio, 100% apresentaram ausência de *S. aureus*. Não foi detectada a presença de *C. perfringens* nas amostras analisadas. Do total de 22 amostras de carne crua, oito (36,36%) apresentaram uma variação do NMP de coliformes fecais de $0,9 \times 10^1$ a $>1,1 \times 10^3$. As condições higiênico-sanitárias na preparação de carne bovina servida na merenda escolar é satisfatória, pois apenas duas amostras de carne crua (9,1%) encontraram-se acima dos padrões, porém a cocção adequada extinguiu esta contaminação. As condições higiênico-sanitárias dos manipuladores, dos utensílios da cozinha e da água de abastecimento nestas instituições de ensino encontram-se em condições satisfatórias sem comprometimento da saúde pública.

PALAVRAS-CHAVE: carne bovina; bacteriologia; higiene; merenda escolar.

ABSTRACT

The sanitary and hygienic conditions of the foods prepared in educational institution kitchens are based on important factors such as: food production process, preparation technique, hygienic conditions of food handling and the kitchen utensils, temperature and cooking time, and distribution and storage conditions. These issues affect directly the microbiologic conditions of the food that is being prepared. The objective of this study is to evaluate the hygienic and sanitary conditions in the preparation of meat used as school meal in the municipal and state institutions, through the *Staphylococcus aureus* count, fecal coliform estimation by the Most Probable Number (MPN), the *Clostridium perfringens* count, and to investigate the hygienic and sanitary conditions of the food handling and kitchen utensils, using swabs for specimen collection to perform the microbiological analysis. There was also an evaluation of the sanitary and hygienic conditions of the water supply of these educational institutions. Twenty two (22) samples of meat served on the school meal of municipal and state institutions were analyzed, before and after cooking; and swabs used on hands of manipulators and knives before manipulation. There was also collection of samples of the water supply used in the kitchens. The methods applied were based on the recommendation of the American Public Health Association (APHA). The microbiological techniques used in this study allow evaluating different characteristic associates with the microorganisms in the raw and cooked meat, manipulator hands and kitchen utensils. The 88 samples (raw meat, cooked meat, manipulators hands and kitchen utensils) presented absence of *S. aureus*. It was not detected *C. perfringens* in the samples. Eight of the 22 samples (36,36%) of raw meat presented variations on the fecal coliform MPN from $0,9 \times 10^1$ to $>1,1 \times 10^3$. The hygienic and sanitary conditions during meat preparation in the school meal was satisfactory, because only two samples of raw meat (9,1%) were above the allowed limits, but the adequate cooking eliminated the contamination. The hygienic and sanitary conditions of the manipulators, kitchen utensils and water supply of these educational institutes were satisfactory and do not affect the public health.

KEY-WORDS: cattle meat; bacteriology; hygiene; school meal.

1 INTRODUÇÃO

As condições higiênico-sanitárias dos alimentos preparados em cozinhas industriais (fábricas, indústrias, escolas, hospitais, etc.), como também em pequenas cozinhas (como as existentes em nossas casas), são baseadas em fatores importantes como, processo de produção do alimento, técnica de preparo, higiene das mãos dos manipuladores e dos utensílios, temperatura e tempo de cozimento e também de produção, distribuição e estocagem deste alimento. O binômio tempo X temperatura é de grande importância, já que o tempo e a temperatura de cozimento irão interferir diretamente sobre a microbiota contaminante existente no alimento que está sendo preparado. Porém é importante ratificar que todos os fatores descritos acima são importantes em cada etapa da produção e/ou preparação do alimento.

Mesmo tendo-se poucos relatos de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (D.T.A.), registrados nos Serviços de Saúde, supõe-se que a ocorrência seja maior, pois há uma precariedade do saneamento básico em nosso meio, assim como há falhas nos cuidados técnicos e, principalmente, no que diz respeito aos aspectos higiênico-sanitários no preparo dos alimentos.

A não utilização das medidas higiênico-sanitárias poderá, conseqüentemente, levar a uma contaminação em qualquer tipo de alimento.

Diante deste possível risco à saúde pública, justifica-se este trabalho, relacionado-o aos aspectos higiênico-sanitários inadequados de manipuladores dos alimentos e, de utensílios utilizados em cozinha institucional; que possam servir de veículos determinando toxinfecções alimentares aos ingestores, cujos quadros nosológicos podem ser de gravidade para crianças, jovens, idosos e/ou imunossuprimidos.

Além disso, as toxinfecções alimentares causam prejuízos econômicos, devido à paralisação das atividades produtivas e/ou pelos gastos com o tratamento médico necessário e/ou pelo desperdício de alimentos.

Os alimentos de origem animal, como a carne bovina, são enquadrados como alimentos de alto risco epidemiológico. Porém, a ocorrência de D.T.A. só é possível pela ingestão de um produto contaminado, que contenha quantidade suficiente de microrganismos patogênicos.

A preparação de grande quantidade de alimentos, como ocorre em instituições de ensino na preparação da merenda escolar, implica em riscos para os estudantes (principalmente as crianças), professores e funcionários em geral, sendo de grande importância a utilização de medidas profiláticas para a diminuição deste problema, através dos aspectos higiênico-sanitários no preparo do alimento, treinamento de pessoal e a informação da educação sanitária.

A utilização de água potável dentro dos padrões de identidade e qualidade vigentes, é também essencial, para que esta não seja fonte de D.T.A. aos ingestores.

A importância dessa pesquisa, deve-se ao fato de que uma vez estabelecidos os Pontos Críticos no que diz respeito aos aspectos higiênico-sanitários no preparo de carne bovina nas cozinhas de instituições municipais de ensino na região metropolitana do Rio de Janeiro, serão recomendadas medidas práticas de controle.

Este trabalho irá contribuir com subsídios que fundamentaria a orientação de funcionários das cozinhas de instituições municipais e estaduais de ensino, ressaltando os pontos críticos de controle que devem ser observados durante o preparo da merenda escolar. Além disso, a realização de ciclos de palestras e/ou cursos nas instituições de ensino contribuiriam, também, para a melhoria da qualidade das refeições escolares.

Devido ao que foi referido acima, este estudo tem como objetivo geral contribuir para os órgãos de Saúde Pública, no que diz respeito às condições higiênico-sanitárias na preparação de refeições, evitando o risco de toxinfecções alimentares. Como principais objetivos específicos, tem: (1) avaliar as condições higiênico-sanitárias na preparação de carne bovina servida em refeições escolares (merenda escolar) em instituições municipais e estaduais de ensino, através da contagem de *Staphylococcus aureus*, número mais provável de coliformes fecais e contagem de *Clostridium perfringens*; (2) investigar as

condições higiênico-sanitárias dos funcionários que manipulam alimentos e de utensílios da cozinha, por meio de *swabs* para coleta de amostras, para a contagem de *Staphylococcus aureus*, número mais provável de coliformes fecais e contagem de *Clostridium perfringens* e (3) avaliar as condições higiênico-sanitárias da água usada no abastecimento, nas instituições de ensino municipais e estaduais, conforme a portaria nº 36 de 19 de janeiro de 1990 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1990, p. 1651-1654).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (D.T.A.)

O alimento é um dos componentes mais importantes da economia de qualquer comunidade e a sua contaminação gera elevados prejuízos financeiros (UNGAR *et al.*, 1992, p. 15).

Segundo ROÇA (1999, n. p.), a carne é um dos alimentos mais nutritivos consumidos pelo homem. É uma excelente fonte de proteína de alta qualidade, de minerais e de vitaminas do complexo B. Não é aconselhável sua substituição por outro alimento. Contudo, a carne e seus derivados são produtos altamente perecíveis, portanto deve ser manipulada com muito cuidado desde as operações de abate até o momento do preparo para o consumo.

Várias doenças podem ser transmitidas através do consumo da carne. Podemos classificá-las em três grupos: (a) doenças que podem instalar-se no homem a partir de animais infectados, como a tuberculose e a brucelose; (b) doenças parasitárias como as teníases, que podem acometer o homem devido ao consumo de carnes bovinas ou suínas com cisticercose; e (c) toxinfecções alimentares, de origens microbianas, ocasionadas pelo consumo

de carnes contaminadas com bactérias patogênicas como *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens* (*ibid.*).

LEITE *et al.* (1988, p. 155), afirmam que as infecções intestinais são, em geral, transmitidas de uma pessoa a outra através de alimentos ou de água contaminados por enteropatógenos. Sendo que os alimentos de origem animal, principalmente a carne, pela sua composição rica em nutrientes, se constituem em meio de cultura excelente para o desenvolvimento de patógenos principalmente os entéricos.

As doenças que atingem mais do que um indivíduo simultaneamente, causadas pelo mesmo alimento, constituem um surto e são mais facilmente notificadas e elucidadas quanto ao agente etiológico e ao veículo transmissor do que as que acometem apenas um indivíduo. Os surtos freqüentemente envolvem alimentação institucional e comunidades de quartéis, hospitais, asilos, escolas e de festividades, pois recebem alimentos com produção centralizada, muitas vezes preparados e acondicionados sem o rigor higiênico-sanitário necessário. A investigação de surtos e casos isolados é comprometida por fatores que vão desde a sua freqüente e relativa benignidade até a falta de uma estrutura de apoio envolvendo laboratórios de diagnóstico e educação médica para a notificação (TÓRTORA, 1998, p. 8).

Para reduzir a ocorrência de D.T.A. é preciso identificar os fatores causais, estabelecer procedimentos viáveis e comunicar tais fatos àqueles que têm condições de pô-los em prática. A maioria das toxinfecções alimentares

pode ser prevenida, porém, esta prevenção requer uma vigilância sanitária constante e adequada por parte daqueles que se dedicam ao controle de alimentos nas indústrias ou nos estabelecimentos comerciais, sejam de órgãos particulares ou autoridades de saúde pública fiscalizadora. A vigilância das D.T.A. tem portanto como principais objetivos a obtenção de notificações, a investigação de surtos, a interpretação dos dados, a divulgação dos resultados e a formulação de recomendações (TANCREDI, 1990, p. 20-21).

De acordo com PELCZAR *et al.* (1981, p. 689-690), a transmissão das infecções intestinais ou entéricas pode ser completamente indireta, quando dejetos de pacientes ou de portadores poluem a água potável ou alimentos. Se indivíduos que hospedam microrganismos participarem da manipulação de alimentos em qualquer fase de sua distribuição, podem contaminá-los, passando a infecção para os consumidores. A mosca comum é também responsável pela veiculação de microrganismos enterais desde o material contaminado até os alimentos. A transferência direta de germes das excreções de pessoas infectadas para a boca de outros indivíduos pode ocorrer, às vezes, por meio das mãos e fômites. Os portadores que podem alojar microrganismos indefinidamente após a cura de uma doença são especialmente importantes na disseminação das moléstias intestinais.

Segundo ROSSI *et al.* (1985, p. 277), os alimentos cárneos, principalmente os preparados em pequenas indústrias, quer pela utilização de matéria prima de qualidade muitas vezes duvidosa, quer pela falta de um

controle higiênico-sanitário no processo de fabricação, geralmente apresentam uma carga microbiana elevada.

De acordo com BRYAN (1993, p. 16), as conseqüências clínicas ou as deteriorações dos alimentos decorrentes de técnicas inadequadas de preparo, existem, porque antes disso ocorre a contaminação seja por microrganismos patogênicos ou deteriorantes. Muitas destas contaminações podem estar presentes na própria matéria-prima utilizada no preparo dos cardápios, como pode ser adicionada durante o processamento.

Segundo CARVALHO & SERAFINI (1996, p. 19), dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1984, em relação às doenças de origem alimentar em vários países industrializados, mostraram que cerca de 70% das ocorrências foram intoxicações causadas pela deficiência no processamento tecnológico dos alimentos servidos em estabelecimentos de alimentação. Vários fatores são importantes e contribuem para a ocorrência de surtos, como por exemplo, a falta de higiene pessoal dos manipuladores de alimentos, o que implica em preparo de alimentos contaminados.

2.2 TOXINFECÇÕES ALIMENTARES

O termo toxinfecção alimentar se emprega corretamente para referir-se a um amplo grupo de enfermidades ou condições clínicas que tem

origem no trato gastrointestinal. A imensa maioria das enfermidades deste tipo, é conseqüência do consumo de comidas ou bebidas contaminadas (HAYES, 1993, p. 23). De acordo com LIBBY (1975, p. 261), o termo toxinfecção alimentar é normalmente usado para identificar todas as doenças relativamente agudas associadas com o consumo de alimento.

Costuma-se dividir as toxinfecções alimentares em dois grupos: (1) toxinfecção alimentar do tipo infecção, que se origina da continuação da ingestão de um alimento em que se teriam multiplicado as bactérias que, uma vez ingeridas, continuariam multiplicando-se no interior do organismo do hospedeiro. As salmonelas são as principais responsáveis por este tipo de toxinfecção alimentar; (2) a do tipo tóxico é uma intoxicação alimentar típica, já que no alimento tem a enterotoxina pré-formada, que teria sido produzida pelas bactérias no alimento antes de seu consumo. A toxina também origina uma gastroenterite aguda, mas a ingestão de bactérias viáveis geralmente não é pré-requisito para que surja a enfermidade. Entre as bactérias causadoras de toxinfecções, tipo intoxicação, incluem-se *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus* (*ibid.*, p. 27). Essa mesma divisão é defendida por ROBERTS (1981, p. 13), com alguns novos enfoques. Segundo este autor, a presença de certos microrganismos nos alimentos ou dos metabólitos originados durante seu crescimento, podem dar lugar a várias enfermidades no homem, que se enquadram nos dois grupos: as intoxicações e as infecções alimentares. Consideram-se intoxicações quando o microrganismo responsável se multiplica no alimento, produzindo uma toxina que, ao ser ingerida, produz a

doença. No caso das infecções o microrganismo encontra-se no alimento e ao ser consumido com ele origina um processo patológico determinado.

Segundo FRAZIER & WESTHOFF (1993, p. 534-535), há três tipos de toxinfecção alimentar. Quando se fala de uma determinada intoxicação alimentar bacteriana refere-se às enfermidades alimentares causadas pela presença de uma toxina bacteriana que se originou no alimento. A expressão infecção alimentar bacteriana refere-se às enfermidades alimentares originadas pela entrada de bactérias no organismo por ingestão de alimentos contaminados e à reação do organismo provocada pela sua presença ou por seus metabólitos. Segundo esta classificação, existem dois tipos principais de intoxicações alimentares produzidas por bactérias: (1) o botulismo, originado pela presença nos alimentos da toxina produzida pelo *Clostridium botulinum*, e (2) a intoxicação estafilocócica, originada por uma toxina existente nos alimentos produzida por *Staphylococcus aureus*. As infecções alimentares podem se dividir em dois tipos: (1) aquelas em que os microrganismos patogênicos não necessariamente se multiplicam no alimento, pois este só atua como veiculador, sendo este o caso de microrganismos patogênicos como os que produzem a tuberculose, a difteria, as disenterias, a febre tifóide, a cólera, a hepatite infecciosa, etc. e (2) aquelas em que o alimento pode servir de cultivo para que os microrganismos patogênicos se multipliquem e alcancem um número que aumentarão a possibilidade de que o consumidor do alimento se infecte; nestes tipos de enfermidades incluem-se as produzidas pelas

espécies de *Salmonella*, por *Vibrio parahaemolyticus*, e por *Escherichia coli* enteropatogênica.

Segundo TORTORA et al. (1993, p. 612), a infecção ocorre quando um patógeno penetra no trato gastrointestinal e se multiplica nele. Os microrganismos podem penetrar na mucosa gastrointestinal e crescer nela ou atravessá-la e alcançar outros órgãos sistêmicos.

Alguns patógenos causam enfermidades elaborando toxinas que afetam o trato intestinal. Uma intoxicação é devido a ingestão de uma toxina pré-formada (ibid.)

Alimentos à base de carne bovina e de carne de frango têm sido os principais causadores de intoxicação alimentar por *Clostridium perfringens*. A maioria dos surtos relatados é associada à alimentação em estabelecimentos institucionais, como restaurantes, hospitais, fábricas, escolas, etc. (FRANCO & LANDGRAF, 1996, p. 41).

ALMEIDA et al. (1995, p. 27), citam que dentre os alimentos comumente distribuídos, os pratos cárneos são os mais freqüentemente incriminados como veículos na transmissão por *S. aureus*, *C. perfringens* e *Salmonella spp.*

Segundo LIBBY (1975, p. 286-287), a maioria das toxinfecções causadas por *C. perfringens* ocorre em instituições como hotéis, escolas, bares, universidades, jantares e *pic-nic* com grande número de participantes.

Os surtos de intoxicação causados por *Staphylococcus aureus* ocorrem, também, principalmente, em hospitais, instituições diversas, restaurantes e refeitórios com grande volume de refeições (HARES et al., 1998, p. 39).

CARDOSO¹, em 1990, descreve que os surtos de toxinfecções alimentares têm sua origem nos manipuladores de alimentos, porque as mãos constituem um excelente veículo para o transporte e difusão de microrganismos patogênicos (apud BELTRÁN et al., 1999, p. 51).

Para ANDRADE (1988, p. 40), os portadores de *S. aureus* desempenham um papel importante na etiologia das infecções estafilocócicas, em restaurantes, hospitais, repartições públicas, etc.

2.3 CARACTERÍSTICAS DOS AGENTES PESQUISADOS

2.3.1 *Staphylococcus aureus*

Os estafilococos são membros da família *Micrococcaceae*. São células esféricas, 0,5 - 1,5 μm de diâmetro, que ocorrem em pares e em tetraedros e caracteristicamente dividem-se em mais de um plano formando

¹CARDOSO, R. C. V. Avaliação do grau de higiene de manipuladores de alimentos em restaurantes industriais do pólo petroquímico de Camaçari. Salvador. **Curso de Especialização em Controle de Qualidade de Alimentos**. Universidade Federal da Bahia. 1990, p. 33.

cachos irregulares. Gram-positivas. São imóveis e não esporulados. Quimiorganotróficos, com metabolismo tanto respiratório como fermentativo. Anaeróbios facultativos. As unidades formadoras de colônia (UFC) em Ágar Sangue, são normalmente opacas e podem ser brancas ou cremes e, algumas, amarelo alaranjadas. São catalase positiva, reduzem nitrato a nitrito. Crescem na presença de 10% a 20% de *NaCl* e entre 18°C e 40°C (bactérias mesófilas), sendo a temperatura ótima entre 30°C e 37°C. Fermentam manitol, produzem lípase e hemolisina. Em relação ao pH, o *S. aureus* cresce na faixa de 4,0 a 9,8; com ótimo entre 6,0 e 7,0. São resistentes a muitos antibióticos. Algumas cepas produzem cápsulas (ROBERTS, 1981, p. 18; SNEATH et al., 1986, p. 1013; RIEDEL, 1992, p. 68; HOBBS & ROBERTS, 1993, p. 103; HOLT et al., 1994, p. 532; FRANCO & LANDGRAF, 1996, p. 43-44; HOBBS & ROBERTS; 1998, p. 96).

Encontra-se amplamente distribuído em pele, nariz e garganta. Não resiste bem ao calor, porém a toxina é termoestável (90% da toxicidade é destruída a 100°C durante 30 minutos). O *S. aureus* produz intoxicações pela elaboração de toxinas antes do alimento ser ingerido (GAVA, 1979, p. 72 e 80).

Segundo PEARSON & DUTSON (1986, p. 238), os estafilococos estão amplamente distribuídos na natureza e são capazes de crescerem em produtos cárneos de bovinos e de aves. Não são capazes de se multiplicarem em temperatura normal de refrigeração e regularmente quando se multiplicam em produtos cárneos de bovinos e de aves, produzem somente pequenas alterações organolépticas (sensoriais). Embora esta bactéria seja morta pelo

cozimento ou processos de altas temperaturas, as enterotoxinas são resistentes a altas temperaturas. O *S. aureus* é capaz de crescer em presença de concentrações de sal que previne o crescimento de outras bactérias e por isso, cresce muito bem em alimentos curados e produtos cárneos e de aves processados se a refrigeração for inadequada.

REED (1993, p. 642) e FRANCO & LANDGRAF (1996, p. 44), descrevem que os alimentos freqüentemente envolvidos em toxinfecções por *S. aureus* têm baixa acidez e uma baixa atividade de água (a_w), os estafilococos são únicos em sua capacidade de crescerem em valores inferiores aos normalmente considerados mínimos para as bactérias não-halofílicas. O valor mínimo da a_w considerado, atualmente, é de 0,86 apesar de sob condições ideais, esta bactéria já ter se desenvolvido em a_w de 0,83. Além disso ele pode crescer em grandes variações de temperatura (6,5°C a 50°C), mas a faixa de temperatura ótima de produção de sua toxina é entre 21°C e 37°C. Porém segundo FRANCO & LANDGRAF (1996, p. 43), esta faixa de temperatura varia entre 40°C e 45°C.

Segundo SILVA JR. & MARTINS (1991, p. 20), o *Staphylococcus aureus* é normalmente proveniente de mãos, secreção nasal e orofaringe. De acordo com LIBBY (1975, p. 273), adultos portadores nasais de *S. aureus*, variam de 30% a 80%. Mãos são, em segundo lugar, fontes de estafilococos. Além disso, estes organismos estão presentes na pele de humanos em 5% a 40%. O suor também é descrito como um bom meio para o crescimento de

estafilococos. Com isso é facilmente aparente que o homem é a mais importante fonte de contaminação de *S. aureus* em alimentos.

O crescimento do *S. aureus* em Ágar Sangue é característico, com unidades formadoras de colônia (UFC) relativamente grandes, lisas, brilhantes, em geral pigmentadas, devido aos pigmentos carotenóides, variando desde um amarelo leve até um laranja forte. Suas UFC geralmente são circundadas por um halo variável de hemólise em placas de Ágar-sangue, devido a produção de hemolisinas. Quase que todas as cepas são produtoras de coagulase, proteína capaz de coagular o plasma, sendo imputadas por muitos como a principal responsável pela virulência dos microrganismos (VERONESI, 1991, p. 276).

De acordo com BOARD (1988, p. 217), para que ocorra a toxinfecção por *S. aureus* é necessário 1 µg de toxina, que para isto são necessárias mais de 5×10^6 microrganismos no alimento ingerido.

Segundo SIQUEIRA (1995, p. 120), a toxina do *S. aureus* é uma proteína simples, facilmente solúvel em água e em soluções salinas e resistente a ação de enzimas. Nos alimentos a toxina não é totalmente inativada pela cocção normal, pasteurização e outros tratamentos térmicos correntes. Calcula-se que, para produzir intoxicação no homem, seja necessário de 0,015 a 0,357 µg de enterotoxina por quilograma de peso corporal.

O *S. aureus* produz várias toxinas que danificam os tecidos ou iniciam a virulência do microrganismo. As enterotoxinas que produzem intoxicação alimentar se classificam em tipos sorológicos que vão de A (que é a

responsável pela maioria dos casos) a D. A produção desta toxina correlaciona-se com uma enzima que coagula o plasma sanguíneo. Tais bactérias são denominadas de coagulase positivas. Não se pode atribuir a esta enzima um efeito patogênico direto mas é de utilidade na identificação preliminar de cepas provavelmente virulentas. As estirpes coagulase positivas são consideradas potencialmente patogênicas (TORTORA *et al.*, 1993, p. 613).

A toxina estafilocócica é termoestável e pode resistir até 30 minutos de ebulição por 30 minutos. Por tanto uma vez formada, a toxina não é destruída ao reaquecer o alimento, ainda que as bactérias morram (LEDERER, 1991b, p. 22; TORTORA *et al.*, 1993, p. 614).

2.3.2 *Clostridium perfringens*

Segundo BIER (1984, p. 86), o *Clostridium perfringens* pertence à Ordem das *Eubacteriales*; à Família *Bacillaceae* e ao Gênero *Clostridium*.

São células em forma de bastão, 0,3-2,0 x 1,5-20,0 μm e freqüentemente em pares ou pequenas cadeias, com um extremo arredondado ou pontiagudo. Comumente pleomórficas. Normalmente espécies Gram-positivas em culturas jovens, normalmente móveis devido aos flagelos peritríquios. Endosporos ovais ou esféricos que geralmente distende a célula. Muitos são quimiorganotróficos; sendo alguns quimioautotróficos ou

quimiolitotróficos também. Podem ser sacarolíticos, proteolíticos, nenhum nem outro, ou ambos. Normalmente produzem misturas de ácidos orgânicos e álcoois provenientes de carboidratos ou peptonas. Não reduzem sulfato. São normalmente catalase negativa e obrigatoriamente anaeróbios; se o crescimento ocorrer no ar, este é escasso e sua esporulação é inibida. Temperatura ótima entre 10°C e 65°C (HOBBS & ROBERTS, 1993, p. 112; HOLT *et al.*, 1994, p. 560; HOBBS & ROBERTS, 1998, p. 103).

O *Clostridium perfringens* tem como habitat normal o solo e o trato intestinal do homem e de alguns animais. Pertence a um gênero anaeróbio, catalase negativo, largamente encontrado no solo, plantas em decomposição e trato intestinal dos animais. Necessita, para desenvolver-se, de mais de 30% de água, condições anaeróbias, menos de 10% de sal e menos de 40% de açúcar (GAVA, 1979, p. 74 & 80).

O *C. perfringens* produz uma série de proteínas biologicamente ativas, algumas com atividade tóxica e outras com atividade enzimática. Tem intensa atividade metabólica em alimentos. É capaz de produzir uma grande variedade de enzimas hidrolíticas extracelulares, incluindo colagenase, hialuronidase, desoxirribonuclease, lecitinase, proteases que hidrolizam caseína e gelatina. É também capaz de fermentar um grande número de carboidratos (glicose, lactose, frutose, galactose, maltose, manose, amido, sacarose), como também fermentar o álcool. Durante a fermentação há intensa produção de gás (H₂ e CO₂) e de produtos finais ácidos. Uma das características mais

importantes de *C. perfringens* é sua capacidade de multiplicação em temperatura alta, estando a temperatura ótima entre 40°C e 45°C. No entanto, para esporulação, a temperatura ótima fica entre 35°C e 40°C. O *C. perfringens* multiplica-se melhor em pH entre 6,0 e 7,0. Os mesmos valores valem também para esporulação. Valores de pH inferiores a 5,0 ou superiores a 8,3 são bastante inibidores para este microrganismo. Com relação à umidade, *C. perfringens* não é muito tolerante a baixa a_w . Para sua multiplicação, a a_w mínima deve estar entre 0,95 e 0,97; e para a esporulação, 0,98; dependendo das demais características intrínsecas do alimento (REED, 1994, p. 16; FRANCO & LANDGRAF, 1996, p. 39-40).

Segundo RIEDEL (1992, p. 68), produz lecitinase; e alguns dos seus esporos são resistentes ao calor (uma a cinco horas) e outros não. O choque térmico provoca germinação dos mesmos. Há aproximadamente 82 sorotipos conhecidos.

Existem cinco tipos de *C. perfringens*, de A a E, a diferenciação é baseada na proporção de antígenos solúveis em cada tipo. Os tipos A, C e D são patogênicos para humanos e os tipos B, C, D e E afetam os animais. O tipo A é o causador de toxinfecção alimentar comum, mas nem sempre branda, e também é associado com gangrena gasosa. O tipo C causa enterite necrótica a qual é freqüentemente fatal (HOBBS, 1973, p. 756).

Segundo BOARD (1988, p. 217), o número de bactérias necessárias para que ocorra a toxinfecção por *C. perfringens* varia de 10^8 a 10^9 UFC no alimento ingerido.

A responsável pela intoxicação alimentar por *C. perfringens* é uma enterotoxina. Ela é uma proteína específica dos esporos e sua produção ocorre quando a bactéria esporula. Esta toxina é termolábil, sendo que 90% de sua atividade se perde em 4 minutos a 60°C . Todos os casos de intoxicação alimentar por *C. perfringens* que se conhecem são causados pelas cepas do tipo A. A doença ocorre após a ingestão de grande número de células vegetativas na qual esporulam no intestino. Uma enfermidade não relacionada com a enterotoxina, a enterite necrótica, é causada pela toxina beta produzida pelas cepas do tipo C, que tem sido denunciada raramente. A enterite necrótica devida ao tipo C tem relação com um índice de mortalidade de 35% a 40%, porém a intoxicação alimentar devida a cepas do tipo A tem sido mortal somente em idosos ou imunodeprimidos (LABBE, 1980, p. 88; JAY, 1994, p. 569; SIQUEIRA, 1985, p. 146).

2.3.3 Coliformes Fecais (*Escherichia coli*)

Forma de bastonete, $1,1-1,5 \times 2,0-6,0 \mu\text{m}$, ocorrendo um a um ou em pares, Gram-negativos, móveis devido aos flagelos peritríquios ou imóveis.

Anaeróbios facultativos, quimiorganotróficos, tendo metabolismo do tipo respiratório ou fermentativo. Temperatura ótima é de 37°C. D-Glicose e outros carboidratos são catabolizados com a formação de ácido e gás. Oxidase negativa, catalase positiva, vermelho metila positiva, Voges-Proskauer negativo, e normalmente citrato negativo. Negativo para H_2S , hidrolisam a uréia e lipase, reduzem nitrato. Possuem 150 antígenos O, 90 antígenos K e 50 antígenos H (RIEDEL, 1992, p. 70; HOLT et al., 1994, p. 179).

Segundo SIQUEIRA (1995, p. 73), o Gênero *Escherichia*, juntamente com os Gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, formam o grupo denominado coliforme. O habitat das bactérias que pertencem ao grupo coliforme é o trato intestinal do homem e de outros animais; entretanto, espécies dos Gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* podem persistir longos períodos e se multiplicar em ambientes não fecais.

Para as bactérias pertencentes a este grupo correspondem aos coliformes totais que apresentam a capacidade de continuar fermentando lactose com produção de gás, quando incubadas à temperatura de 44°C-45,5°C. Nessas condições, ao redor de 90% das culturas de *Escherichia coli* são positivas, enquanto entre os demais gêneros, apenas algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* mantêm essa característica. A pesquisa de coliformes fecais ou de *E. coli* nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação da eventual

presença de enteropatógenos (GAVA, 1979, p. 72; SILVA JR. & MARTINS, 1991, p. 20; FRANCO & LANDGRAF, 1996, p. 28).

As linhagens de *Escherichia coli* consideradas patogênicas são, atualmente, agrupadas em cinco classes: EPEC (*Escherichia coli* enteropatogênica clássica), EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasora), ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigênica), EHEC (*Escherichia coli* entero-hemorrágica) e EAaggEC (*Escherichia coli* enteroagregativa), esta classificação é feita através dos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia (FRANCO & LANDGRAF, 1996, p. 50).

Diferente dos outros grupos de *E. coli*, a enterohemorrágica (EHEC) sorotipo O157:H7 é caracterizada por falta de capacidade para fermentar sorbitol em 24 h e hidrolisar 4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo (MUG); além de produzir uma ou mais toxinas semelhantes a *Shigella* (*Shiga-like* - SLT), também chamada de Verotoxina (VT) (MENG et al.; 1994, p. 179).

BOYCE et al. (1995, p. 365), descrevem que a *E. coli* O157:H7 não faz parte da microbiota normal em intestinos humanos.

Segundo TAUXE (1998, p. 10), as doenças causadas por *E. coli* são devido a sua toxina, na qual podem ser incluídas a falência renal e até a morte. As doenças praticamente não podem ser tratadas, embora o organismo seja sensível ao antibiótico, com o seu uso aumenta-se a produção de toxina *in vitro*, prejudicando o paciente.

2.4 QUADRO CLÍNICO CAUSADO PELOS AGENTES DAS TOXINFECÇÕES

A maioria das importantes enfermidades alimentares de origem microbiana tem como denominador comum o curto período de incubação, que varia de duas a dez horas, e de um quadro clínico gastroentérico (diarréia, vômitos, dor abdominal, etc.) com febre ou não, e certas peculiaridades em alguns casos. Em geral, são enfermidades de curta duração, nas quais é comum a recuperação total dos pacientes sem tratamento médico. Porém é possível ocorrer complicações graves e inclusive morte, particularmente em indivíduos muito jovens, idosos ou debilitados (MOSEL & GARCIA, 1985, p. 9).

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

O período de incubação de um surto varia de 30 minutos a oito horas, sendo a média de duas a quatro horas, após a ingestão do alimento contaminado. Os sintomas variam com o grau de suscetibilidade do indivíduo, concentração da enterotoxina no alimento e a quantidade consumida do alimento. Os principais sintomas são náuseas, vômitos, câimbras abdominais geralmente bem dolorosas, diarréia e sudorese. Podem ocorrer ainda dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial e, raríssimas vezes, febre, quando a quantidade de toxina ingerida for grande. A doença não é fatal, a menos que o

indivíduo esteja debilitado. Quando há choque, desidratação e muito vômito, é necessária a hospitalização para que os fluidos e os eletrólitos sejam repostos (FRANCO & LANDGRAF, 1996, p. 44).

As enterotoxinas do *S. aureus* podem provocar diarreias graves, que às vezes vêm acompanhada de colapso circulatório. Os estafilococos podem penetrar nos alimentos durante a preparação, a partir de feridas supuradas ou mucosas nasais ou da faringe. Nos casos graves podem aparecer: dor de cabeça, câimbras musculares, prostração, febre ou hipotermia e, às vezes, uma brusca queda da pressão sangüínea (de 120/80 mmHg para 60/40 mmHg) (ROBERTS, 1981, p. 18; LINDNER, 1995, p. 147).

Os períodos de incubação e sintomas têm uma pequena variação, de acordo com diferentes literaturas.

Sintomas aparecem de uma a seis horas depois, constituídos principalmente de vômitos e diarreia. Os casos fatais são raros, e somente quando a intoxicação está associada com outras doenças ou crianças mal nutridas (GAVA, 1979, p. 80). Período de incubação, segundo SILVA (1996, p. 279), varia de uma a seis horas, sendo que os principais sintomas são vômitos e náuseas, raras diarreias, sem febre. Este período de incubação varia de uma a sete horas, usualmente duas a quatro horas, segundo RIEDEL (1992, p. 68), com repentino mal-estar, náuseas, salivação, vômito, convulsões, diarreia, dores abdominais, desidratação, suores, fraqueza, prostração. Febre geralmente não ocorre. Curta duração, não mais que um dia ou dois.

VERONESI (1991, p. 280), descreve que a ingestão de alimentos com toxinas estafilocócicas provoca, de uma a seis horas após, quadro agudo com náuseas, vômitos, diarréia aquosa e dor abdominal que cede em 24 a 48 horas. Em crianças pequenas e desnutridas, este quadro pode ser severo e causar desidratação intensa e provocar a morte.

Segundo STEHULAK (1998, n. p.), é difícil determinar como ocorre a toxinfecção por estafilocos, pois muitas pessoas não a relatam ou confundem-na com os sintomas de outras infecções. Mortes causadas por estafilococos são raras, embora casos semelhantes tenham ocorrido entre os idosos, crianças, e pessoas doentes.

Sabe-se que a responsável pelo quadro clínico, é a estafilotoxina, secretada em quantidade que está na razão direta da multiplicação do estafilococo nos alimentos. Esta toxina age localmente por via periférica sobre as terminações nervosas gastrointestinais (LEDERER 1991b, p. 22).

2.4.2 *Clostridium perfringens*

A dose de infecção varia de 10^8 a 10^9 bactérias. A intoxicação manifesta-se, principalmente, por diarréia. O período de incubação é de oito a 24 horas (média de 12 horas) e a diarréia tem duração de um a dois dias. Os vômitos são raros. Os sintomas, principais, descritos na literatura são dores

abdominais agudas, ocasionalmente desidratação e prostração, sendo febre e calafrios raros. Com curta duração, de um dia ou menos (GAVA, 1979, p. 80; TRABULSI, 1991, p. 184; RIEDEL, 1992, p. 68; SILVA, 1996, p. 282).

Segundo PEARSON & DUTSON (1986, p. 174), o *C. perfringens* é a maior preocupação quanto ao potencial de risco de intoxicação alimentar em produtos cárneos cozidos.

Os sintomas podem persistir por mais tempo em algumas pessoas, especialmente muitos jovens ou idosos. A desidratação pode ocorrer. Porém muitas pessoas confundem esta toxinfecção com uma gripe de 24 horas ("24-Hour flu"), sendo dificilmente identificada como Doença Transmitida por Alimentos (D.T.A.) e conseqüentemente, notificada como tal (ROHRS, 1998, n. p.).

O *C. perfringens* se multiplica no trato intestinal e produz uma enterotoxina responsável pelos sintomas característicos de dor abdominal e diarreia. A toxina altera a permeabilidade da parede intestinal e a perda resultante de água e eletrólitos produz o quadro diarréico (TORTORA et al., 1993, p. 619). A toxinfecção por *C. perfringens* é causada por uma enterotoxina termolábil, que rompe a membrana das células epiteliais, resultando em diarreia. As células bacterianas não agem diretamente no hospedeiro, mas simplesmente como sintetizadoras de enterotoxina. (ANDERSSON et al. 1995, p. 152). A enterotoxina do *C. perfringens* é relativamente insensível às enzimas intestinais (NARAYAN, 1982, p. 12 & 22).

Já GENIGEORGIS (1975, p. 822), descreve que a toxina do *C. perfringens* pode se manter estável no estômago se o indivíduo ingerir muita quantidade de alimento capaz de inibir o ácido gástrico.

2.4.3 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e a *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC), têm incubação de 12 a 72 horas (média de 11 horas), e produzem sintomas como febre, calafrios, dores de cabeça, mialgia, espasmos abdominais, diarreia aquosa profusa semelhante à *Shigella*, vômito, febre, cólica, mal estar e calafrios. Estudos realizados com voluntários adultos indicam que a dose de infecção é de 10^6 a 10^8 células. A *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), tem incubação de oito a 72 horas e produz diarreia sanguinolenta, vômito, febre, cólica, mal estar e calafrios. A *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), tem período de incubação de oito a 72 horas (média de 26 horas), e a doença é caracterizada por diarreia semelhante à água de arroz, vômito, cólica, náuseas sem febre, desidratação e choque, semelhante à Cólera. As cepas de EA_gEC parecem estar associadas com casos crônicos de diarreia ("*diarria protraída*"). Sua ocorrência em alimentos ou em casos de surtos de origem alimentar ainda não foi relatada (RIEDEL, 1992, p. 70; FRANCO & LANDGRAF, 1996, p. 51-55; SILVA, 1996, p. 285).

A população susceptível é formada por crianças com idade inferior a 10 anos, idosos e indivíduos imunodeficientes. A enterocolite pode evoluir para uma doença grave chamada Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS). A dose infecciosa é baixa: um a 50 UFC/g do alimento (ibid., p. 54).

A *E. coli* O157:H7 pode causar infecção assintomática, diarreia sem sangue, diarreia hemorrágica (colite hemorrágica), Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS), trombocitopenia púrpura, e morte (BOYCE et al., 1995, p. 365).

Em 1992, a *E. coli* O157:H7 foi identificada como a mais comum bactéria causadora de diarreia hemorrágica nos Estados Unidos. A HUS e a colite hemorrágica são duas manifestações severas, que se desenvolvem em 2% a 7% das pessoas infectadas. A HUS afeta principalmente jovens e freqüentemente leva a uma doença renal crônica (MORRIS JR., 1996, p. 2046).

LANDGRAF (1997, p. 6), afirma que a sintomatologia varia desde uma simples diarreia aquosa a: (1) colite hemorrágica com dores abdominais intensas, diarreia sanguinolenta, ausência de febre e rara presença de vômitos; (2) Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS), que afeta principalmente crianças, levando a falência renal aguda; (3) Púrpura Trombocitopênica Trombótica (TTP), que atinge o sistema nervoso central, principalmente de idosos, com formação de coágulos no cérebro e, subseqüentemente, morte.

Segundo HARES et al. (1998, p. 30), a colite hemorrágica é caracterizada inicialmente por dores abdominais seguidas de diarreias, nas

quais freqüentemente ocorrem sangramentos. Podem ocorrer vômitos, cólicas, mal-estar e calafrios, mas não há febre.

A Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS) é uma complicação da colite hemorrágica que ocorre em crianças infectadas com *E. coli* O157:H7, podendo levar à morte. Os sintomas incluem dores abdominais agudas, diarreia com sangramento e febre baixa que pode aparecer como consequência de um agravamento, ocorrendo em cerca de 10% dos casos. Na HUS, ocorre destruição de eritrócitos e falha aguda dos rins, levando inclusive à necessidade de diálise, transplante dos rins e, até mesmo, à morte. Quando ocorre em adultos, a HUS pode se tornar uma doença do sistema nervoso central podendo implicar em um estado de coma. Os pacientes que desenvolvem um coágulo no cérebro geralmente acabam morrendo (ibid., p. 30-31).

2.5 EPIDEMIOLOGIA

Informações relativas à intoxicação alimentar por *Clostridium perfringens* (*Clostridium welchii*) foram publicadas por Klein², em 1895, na Alemanha; e Andrews³, em 1899, sobre um surto, em um hospital, devido a um

²KLEIN, E. Über einen pathogenen anaëroben Darmbacillus, *Bacillus enteritidis sporogenes*. **Zentbl. Bakt. Parasitikde.** 1895. (Abt 1) Orig. 18, 737-743.

³ANDREWS, F. W. On an outbreak of diarrhoea in the wards of St. Bartholomew's hospital, probably caused by infection of rice pudding with *Bacillus enteritidis sporogenes*. **The Lancet.** 1899. 1, 08-09.

pudding de arroz. Quase 50 anos depois KNOX & MacDONALD⁴, em 1943, descreveram surtos de intoxicação alimentar em crianças que ficaram doentes após a refeição na escola, devido ao molho de carne preparado um dia antes, sendo contaminado com esporos de bacilos anaeróbios incluindo *Clostridium perfringens* (*Clostridium welchii*). McCLUNG⁵, em 1945, também descreveu surtos de intoxicação alimentar devido a este organismo em frangos, nos Estados Unidos. Alguns anos depois HOBBS *et al.*⁶, em 1953, estabeleceu que o *Clostridium perfringens* tipo A é o maior responsável pelas gastroenterites (*apud* HOBBS, 1973, p. 752).

FRUIN (1978, p. 768), isolou de 152 amostras de carne moída com *C. perfringens*, 149 (98%) com *C. perfringens* tipo A e de 13 salsichas curadas, também contaminadas, 10 (77%) com o mesmo tipo A de *C. perfringens*, sendo este indicativo de infecção de origem alimentar.

Dois casos de surtos por *Clostridium perfringens*, foram descritos, devido ao preparo do alimento no dia anterior, refrigeração imprópria e reaquecimento inadequado de produtos a base de carne, em escolas americanas: um em 1969, onde o "Center for Disease Control and Prevention" (CDC⁷) notificou que 76 pessoas que ficaram doentes ao consumirem carne

⁴KNOX, R. & MacDONALD, E. K. Outbreaks of food poisoning in certain Leicester institutions. **Med. Officer**. 1943. 69, 21-22.

⁵McCLUNG, L. S. Human food poisoning due to growth of *Clostridium perfringens* (*Clostridium welchii*) in freshly cooked chicken. Preliminary note. **J. Bacterial**. 1945. 50, 229-231.

⁶HOBBS, B. C.; SMITH, C. L.; OAKLEY, G. H. *et al.* *Clostridium welchii* food poisoning. **J. Hyg.** 1953. 51, 75-101.

⁷CDC. *Clostridium perfringens* food poisoning Memphis, Tennessee. **Morbidity Mortality Weekly Report**. 1969. 18 (52):442.

moída; e outro no ano de 1972, quando o mesmo CDC⁸ identificou que 288 pessoas foram intoxicadas ao se alimentarem de espaguete com molho de carne (apud BRYAN, 1980, p. 144).

No Brasil, ROSSI JR. et al. (1985, p. 275–277), relataram que de 30 amostras de hambúrgueres de carne bovina oriundas de lanchonete, foram isolados Clostrídios Sulfito Redutores (a 44°C) em cinco (16,66%). Outros estudos revelaram que de 56 amostras de produtos cárneos pesquisadas, 19 amostras (33,93%) estavam contaminadas com bactérias sulfito redutoras; isto demonstra perfeitamente a importância da identificação da microbiota anaeróbica, principalmente o gênero *Clostridium*, com conseqüente comprometimento do produto, sob o ponto de vista de saúde pública (RUDGE, 1982, p. 112). Ainda no Brasil, na cidade de Campinas, São Paulo, um grande surto provocado por *C. perfringens* ocorreu em 1978 devido ao consumo de carne assada, envolvendo cerca de 500 pessoas em dois restaurantes. Em 1981, um outro surto, envolvendo mais de 700 pessoas ocorreu em Jaboticabal, São Paulo, em um restaurante universitário com o consumo de carne de porco assada (HARES et al., 1998, p. 29).

No Canadá, no período de 1975 a 1984, em um total de 253 agentes etiológicos de doenças de origem alimentar em carne, 59 (23,3%) foram causados por *C. perfringens*, três (1,2%) pela *E. coli* O157:H7 e 79 (31,2%) pelo *S. aureus* (TODD, 1992, p. 131).

⁸CDC. *Clostridium perfringens* - Washington. Spaghetti sauce mix. **Morbidity Mortality Weekly Report.** 1972. 21 (19):163, 168.

BEAN et al. (1997, p. 1265), descreveram sobre os dados coletados pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), entre 1988 e 1992, nos Estados Unidos, de surtos causados por doenças transmitidas por alimentos, o número de casos de cada surto e o número de vítimas mortais.

Staphylococcus sp. excederam a 10^3 microrganismos/grama em 30 (100,00%) amostras de carne de hambúrguer produzido em lanchonete, sendo que em quatro (13,33%) destas, isolou-se *S. aureus* com contagens superiores a 10^3 microrganismos/grama (ROSSI JR. et al., 1985, p. 272 e 275).

Segundo SILVA JR. & MARTINS (1991, p. 22), de 66 panelas analisadas microbiologicamente, em 12 (18%) foram isoladas *Escherichia coli* e em três (4,5%), *Staphylococcus aureus*.

SIMONE, et al. (1997, p. 443), relataram a incidência de surtos e casos de doenças transmitidas por alimentos, por *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, identificados pelo serviço de inspeção de alimentos na Holanda, no período de 1991 a 1994 (Tabela 1).

Em 1988, foram relatados 451 surtos de toxinfecção alimentar envolvendo 15732 pessoas, com um número total de 19 mortes. O *S. aureus* foi responsável por oito surtos, 245 casos e nenhuma morte. A *E. coli* O157:H7 causou dois surtos. Um surto (54 casos) foi causado pelo patê de carne pré-cozido servido em uma cantina escolar, e outro surto (55 casos) foi causado por uma carne assada servida em um banquete universitário (ibid., p. 1266-1267).

Durante o ano de 1989, 515 surtos com 15867 casos, com 17 mortes. O *C. perfringens* causou sete surtos (436 casos) e nenhuma morte. A *E. coli* foi responsável por apenas um surto (três casos) e nenhuma vítima mortal; enquanto que o *S. aureus* causou 14 surtos (524 casos), também sem mortalidade (ibid., p. 1267-1268).

No ano de 1990, foram registrados 532 surtos envolvendo 19885 indivíduos, com 15 mortes. O *C. perfringens* provocou 11 surtos (1240 casos), porém com nenhuma vítima mortal. Destes, práticas inadequadas de manipulação do alimento resultaram em dois surtos por *C. perfringens*: alimentos a base de carne e frango foram veículos em um surto (700 casos) em uma prisão no Missouri, e costeletas de porco foram veículos no surto (204 casos) em um restaurante em Wisconsin. A *E. coli* foi responsável por dois surtos (80 casos) e nenhuma morte. *S. aureus* com 13 surtos (327 casos) e nenhuma morte (ibid., p. 1267, 1274-1275).

Já em 1991, foram identificados um total de 528 surtos (14876 casos) com 10 vítimas mortais. *C. perfringens* foi responsável por 10 surtos (1213 casos). Um dos surto (600 casos) de intoxicação por *C. perfringens* foi causado por manipulação imprópria de carne de peru servida em um restaurante em Wisconsin. Três dos surtos (33 casos) foram causados por *E. coli* O157:H7. Já o *S. aureus* causou nove surtos (331 casos). Em todos estes surtos não houve casos de vítimas fatais (ibid., p. 1268 e 1281).

Em 1992, foram relatados 407 surtos (11015 casos), com oito mortes. O *C. perfringens* causou 12 surtos (912 casos); *S. aureus* seis surtos (206 casos); e *E. coli* foi responsável por três surtos (19 casos). Não houve casos de vítimas mortais em nenhum dos surtos (ibid., p. 1268 e 1281).

MATHIEU et al. (1991, p. 119), testaram 52 amostras de carne bovina fresca em Lubunbashi (Zaire), identificando 13 (25,0%) amostras com presença de enterotoxinas estafilocócicas, sendo que nove (69,2%) destas foram positivas para enterotoxina A.

Em 1988, LEITE et al. (p. 161), publicaram que, 56% das amostras de produtos cárneos crus estudados apresentaram um número mais provável de coliformes fecais acima de 5×10^2 /g, estando portanto fora dos padrões brasileiros.

De acordo com o "*United State Food and Drug Administration*" – USFDA (1992a, n. p.), a intoxicação alimentar por *Clostridium perfringens* é a mais comum nos Estados Unidos. Houve 1162 casos em 1981, em 28 surtos. No mínimo 10-20 surtos têm sido relatados anualmente nos Estados Unidos. Dezenas ou centenas de pessoas são afetadas. É provável que muitos surtos não sejam relatados pois os alimentos implicados ou as fezes dos pacientes não são testadas rotineiramente para *C. perfringens* ou sua toxina. O "*Center for Disease Control and Prevention*" (CDC) estima que cerca de 10000 casos ocorrem anualmente nos Estados Unidos.

Em novembro de 1985, um grande surto de intoxicação alimentar por *C. perfringens* ocorreu envolvendo operários de uma fábrica em Connecticut, onde 44% dos 1362 trabalhadores foram afetados. Quatro pratos principais, que foram servidos no banquete, foram associados com a doença, mas o molho de carne foi o responsável pela intoxicação. O molho de carne foi preparado 12-24 horas antes de ser servido, além de resfriado inadequadamente, ele teve um breve reaquecimento antes de ser servido (ibid.).

MARTH (1985, p. 292–293), descreve que as três principais causas de surtos relatados por erros feitos na indústria de alimentos em 1981 foram *C. perfringens*, *Salmonella spp.* e *S. aureus*. Os principais fatores que contribuíram para os surtos em 1981, foram cozimento inadequado, uso de alimento de fonte insegura, e pobre higiene pessoal.

REGAN et al. (1995, p. 69), descreveram um surto causado por *C. perfringens*, afetando 17 (38,6%) de 44 pacientes internados em duas enfermarias hospitalares, associado com o consumo de carne suína contaminada.

BRYAN & MCKINLEY (1979, p. 4 e 6), isolaram *C. perfringens* de carne crua, equipamentos e carne cozida e *S. aureus* de carne crua, equipamentos, manipuladores e carne cozida (Tab. 2).

Embora se dê grande atenção às condições do processamento industrial de alimentos de origem animal, alguns pesquisadores, utilizando

informações do CDC, vêm demonstrando que cerca de 5% dos casos de toxinfecções alimentares relatados, devem-se às condições inadequadas de produção nas indústrias. A maioria dos casos (75%) se deve às más condições de cozinhas industriais, restaurantes, hospitais, etc., e cerca de 20% à incorreta manipulação em cozinhas domésticas (REIS JR. & BRANDÃO, 1996, p. 5).

Somente em 1982, *Escherichia coli* O157:H7 foi identificada como um microrganismo patogênico, devido à ocorrência de dois surtos, respectivamente, em Oregon e Michigan, nos Estados Unidos, em fevereiro/março e maio/junho, afetando, no mínimo 47 pessoas. Esses surtos foram associados ao consumo de hambúrgueres mal cozidos. Desde então, diversos surtos de colite hemorrágica, ocorridos nos Estados Unidos, Canadá e Japão, foram atribuídos ao consumo de hambúrgueres e outros produtos à base de carne bovina. Por isso, a síndrome por *E. coli* O157:H7 tem recebido a denominação de "*doença do hambúrguer*" (HARES et al., 1998, p. 32).

Em relatos de surtos por *E. coli* O157:H7, nos Estados Unidos, 23% de pacientes foram hospitalizados, 6% tiveram Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS) ou Trombocitopenia Púrpura, e 1,2% morreram. A partir destes dados, estima-se que 250 mortes por ano nos Estados Unidos, sejam causadas por *E. coli* O157:H7. Porém nem as mortes de pacientes, infectados por *E. coli* O157:H7, foram devido a HUS. Desses surtos, sete (36,8%) dos 19 pacientes que morreram, não tinham HUS ou Trombocitopenia Púrpura; todos os sete eram idosos (BOYCE et al., 1995, p. 365-366).

De acordo com MORRIS JR. (1996, p. 2046), acredita-se que a *E. coli* O157:H7 seja a causadora de 85% a 90% de casos de HUS e falência renal aguda em crianças jovens e infantis, nos Estados Unidos, com uma razão de morte de 2,0% a 2,5% do total de pacientes afetados.

CREMER & CHIPLEY (1980, p. 1476), avaliaram microbiologicamente as fases de cocção de carne (antes e após a cocção), encontrando maior carga bacteriana na carne crua (Tabela 3).

O USFDA (1992b, n. p.), cita que das bactérias patogênicas causadoras de doenças transmitidas por alimentos (D.T.A.) nos Estados Unidos (127 surtos, 7082 casos, em 1983), 14 surtos envolvendo 1257 casos foram causados por *Staphylococcus aureus*. Estes surtos foram seguidos por 11 surtos (1153 casos) em 1984, 14 surtos (421 casos) em 1985, sete surtos (250 casos) em 1986 e um surto (100 casos) em 1987.

É importante destacar que, segundo SMITH (1998, p. 1229), os idosos (≥ 65 anos) são mais sensíveis a toxinfecções que os indivíduos jovens. Diversos fatores contribuem para isto, como: diminuição da imunidade humoral e celular; mudanças, relativas à idade, no trato gastrointestinal (diminuição da produção de ácido gástrico e diminuição da motilidade intestinal); má nutrição; falta de exercícios; internação em casas de repouso; e uso excessivo de antibióticos.

SMITH (*ibid.*, p. 1235), descreve que o *C. perfringens* e o *S. aureus*, dois patógenos responsáveis por toxinfecções alimentares, parecem ser

mais comuns em indivíduos de casas de repouso (idosos) do que na população em geral.

CARDOSO⁹, em 1990, ao analisar o grau de higiene de manipuladores de alimentos em restaurantes industriais do pólo petroquímico de Camaçari, verificou que 97,3% das amostras apresentaram-se positivas para coliformes fecais e 40,5% para *S. aureus*. Esta constatação indicou acentuada contaminação por "*material fecal*" nos manipuladores, assim como higiene inadequada das mãos antes e após cada manipulação (apud BELTRÁN *et al.*, 1999, p. 51).

2.6 IMPORTÂNCIA DA HIGIENIZAÇÃO

SILVA JR. & MARTINS (1991, p. 20), classificam o ambiente analisado segundo os microrganismos encontrados: (1) condições inadequadas de higienização, quando no ambiente existirem sujidades macroscópicas, resíduos de alimento e gordura, dispensando a análise microbiológica; (2) condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, quando estiver presente no ambiente *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, Clostrídios Sulfito Redutores, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*; e (3) condições

⁹CARDOSO, R. C. V. Avaliação do grau de higiene de manipuladores de alimentos em restaurantes industriais do pólo petroquímico de Camaçari. Salvador. **Curso de Especialização em Controle de Qualidade de Alimentos**. Universidade Federal da Bahia. 1990, p. 33.

higiênicas insatisfatórias, quando são encontrados coliformes totais (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*), *Proteus spp.*, *Enterococcus* e Bolores e Leveduras na maioria das amostras.

A presença de bactérias entéricas nos alimentos, como os coliformes, indica geralmente uma contaminação direta ou indireta de origem fecal. A *Escherichia coli* é um indicador clássico da possível presença de patógenos entéricos na água e nos alimentos, e números elevados de *Escherichia coli* sugerem uma falta geral de limpeza na manipulação e no armazenamento inadequado (SILVA & SERAFINI, 1997, p. 27).

Segundo PEARSON & DUTSON (1986, p. 258), devido a onipresença da *E. coli* em fezes de animais, é comum a contaminação de carcaças e cortes de carne durante o abate e processamento. Essa bactéria pode multiplicar-se nas superfícies dos equipamentos, e assim, sua presença na carne pode não ser um indicativo de contaminação fecal direta.

A maior parte de surtos de toxinfecção devido a contaminação alimentar por *Staphylococcus* deve-se ao manuseio dos alimentos cozidos pelas pessoas que transportam *Staphylococcus* enteropatogênicos em suas fossas nasais ou pele (BRYAN, 1988, p. 667).

De acordo com SIQUEIRA (1995, p. 120) e SILVA & SERAFINI (1997, p. 27), a presença de *S. aureus* nos alimentos é interpretada, em geral, como indicativo de contaminação a partir da pele, boca, e das fossas nasais dos

manipuladores de alimentos, bem como da limpeza e da sanificação inadequada dos materiais e dos equipamentos.

Segundo VERONESI (1991, p. 277), as moscas constituem importante fonte de contaminação do meio e dos alimentos. Estudos têm demonstrado que o *Staphylococcus aureus* pode permanecer nas patas das moscas por até três dias e, no intestino, por até uma semana, facilitando assim a disseminação dos microrganismos.

Segundo FIGUEIREDO (1998, p. 5), as doenças transmitidas por baratas são, de um modo geral, de natureza gastrointestinal. Contaminações alimentares graves pela bactéria emergente *E. coli* O157:H7 têm grande chance de ter a barata como agente intermediário na cadeia de transmissão.

As mãos devem ser lavadas toda vez que se muda de atividade durante o período de trabalho, em especial quando se deixa de preparar ou manipular carne crua e alimentos crus, passando-se a manipular carne cozida e alimentos cozidos. As mãos devem ser lavadas (no lavatório destinado especificamente a esta finalidade) com um sabão bactericida, sendo as unhas esfregadas com uma escova de unhas, e adequadamente secadas, depois de usar o banheiro; entre a manipulação de alimentos crus e cozidos; ao entrar na área de preparação dos alimentos e antes de usar equipamento ou manipular qualquer tipo de produto alimentício; depois de comer, fumar ou assoar o nariz e depois de manipular lixo ou restos de alimentos (HAZELWOOD & McLEAN, 1994, p. 24-25).

Qualquer tipo de ferimento na pele é um lugar ideal para a multiplicação das bactérias. Todos os ferimentos devem ser cobertos com algum tipo de proteção à prova d'água, de cor viva, pois se a bandagem cair no meio dos alimentos, durante o processo de preparação, poderá ser encontrada com facilidade e os alimentos destruídos, reduzindo a possibilidade de contaminação (*ibid.*, p. 25-26).

A incidência de toxinfecções alimentares devido a manipulação incorreta dos alimentos, tanto em estabelecimentos que servem comidas como a nível de consumidor, é mais elevada do que a correspondente às indústrias que somente tratam os alimentos (FRAZIER, 1993, p. 646).

HOFFMANN *et al.* (1998, p. 53), descrevem que em cada uma das fases utilizadas no processo e/ou manuseio de carnes, assim como naquelas envolvidas no processamento de diferentes produtos cárneos devem prevalecer condições higiênicas rigorosas, para não ocasionar a contaminação microbiana do produto final, que poderia levar a sua deterioração, e/ou torná-lo impróprio para o consumo.

Os utensílios e equipamentos (como facas de cozinhas, conchas, escumadeiras, panelas, peneiras, assadeiras, tábuas de madeira, travessas, copos e batedores da batedeira, liquidificadores, moedores, etc.), que entram em contato com os alimentos durante a preparação e a sua distribuição são classificados em ambientes de risco, podendo haver contaminação e posterior reprodução de microrganismos patogênicos nos alimentos. Entretanto, os

utensílios que entram em contato com alimentos apenas para o consumo imediato (como pratos, bandejas, cambucas, garfos, facas, colheres, etc.), são classificados em ambientes de baixo risco (SILVA JR. & MARTINS, 1991, p. 20–21).

Segundo SILVA & SERAFINI (1997, p. 26), a maior parte dos alimentos se converte em perigo potencial para o consumidor só depois de terem sido violados os princípios da higiene, ou se os alimentos permanecem em condições que possam ter permitido a penetração e/ou a multiplicação dos agentes infecciosos ou toxigênicos, podendo constituir-se em veículo de transmissão de enfermidades, como salmoneloses ou a intoxicação estafilocócica.

2.7 FATORES QUE INFLUENCIAM A CONTAMINAÇÃO BACTERIANA

TODD (1983, p. 738), descreveu os principais fatores de contaminação alimentar e, sobrevivência e crescimento microbiano, que contribuem com as doenças transmitidas por alimentos (D.T.A.) no período de 1973 a 1977, no Canadá (Tabela 4). Segundo HINGLEY (1997, n. p.), para se evitar a contaminação por patógenos em alimentos é necessário saber como estes alimentos foram contaminados durante a produção, processamento e distribuição. Estudos mostram que 50% dos consumidores comem ovos crus ou

mal passados, 23% comem hambúrgueres mal passados, 17% consomem moluscos e ostras crus, e 26% não lavam a tábua de corte após o uso com carnes cruas. Além disso, muitas vezes, os preparadores e manipuladores de alimentos desconhecem os riscos e segurança para as práticas de manipulação de alimentos.

WORSFOLD & GRIFFITH (1997, p. 97), avaliaram 108 consumidores em seus lares, em relação a segurança alimentar, usando observação direta e medindo as temperaturas nas diferentes etapas da preparação do alimento. A Tabela 5 mostra a incidência das principais formas inadequadas de conduta nos estágios da preparação do alimento.

Estudos no Brasil, envolvendo 200 zebuínos machos, indicaram uma prevalência de 89% de *C. perfringens* tipo A no ceco. E somente dois (1%) em linfonodos mesentéricos. Diferenças devido a idade, origem, peso da carcaça, ou achados *post mortem* não foram significantes. Entretanto uma prevalência alta e significativa foi encontrada em animais transportados por ferrovias, em vez de caminhões, e em dias secos versus dias chuvosos. Os efeitos de dias secos e transporte em trem, aparentemente, aumenta a prevalência do *C. perfringens* (GENIGEORGIS, 1975, p. 824).

Durante a evisceração, a carcaça pode ser contaminada pela microbiota gastrintestinal, aparelho respiratório, urina e leite, que são fontes evidentes de contaminação. Geralmente a *E. coli* domina a microbiota do couro

e do intestino bovino; e, por esse motivo, este microrganismo é utilizado como indicador de contaminação de carcaças (SILVA, 1997, p. 64).

Segundo BOYCE et al. (1995, p. 364), a carne pode ser contaminada por *E. coli* O157:H7 durante o abate, pois cerca de 1% do gado saudável apresenta em seus intestinos a *E. coli* O157:H7, e no processamento da carne pode-se transferir patógenos da superfície da carne para o seu interior. Como a carne processada pode-se incluir carne de várias carcaças, um pequeno número de animais infectados pode contaminar uma grande quantidade de carne.

A carne, quando proveniente de animal sadio, é praticamente estéril, tendo porém sua superfície contaminada pela poeira e manipulação, após o esartejamento. Os produtos cárneos são alimentos sujeitos à grandes contaminações, por serem excelentes meios de cultura para o desenvolvimento e multiplicação dos microrganismos (FLORENTINO et al., 1997, p. 38).

MOSSEL & GARCIA (1985, p. 8), afirmam que a contaminação por microrganismos, seguida de um abuso na temperatura de conservação, que traz como consequência a multiplicação destes microrganismos, são os principais fatores que contribuem para ocorrer uma toxinfecção alimentar. Na Tabela 6, estão relacionados as principais causas dos surtos de doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos no período de 1968-1977.

Em 1997, NOTERMANS & BORGDORFF (p. 1396), citaram que os fatores mais relevantes que contribuíram para surtos de toxinfecções na

Europa, no período de 1992 a 1994, foram: refrigeração inadequada; higiene geral imprópria; contaminação por pessoa infectada; aquecimento inadequado; uso de equipamento contaminado; uso de ingredientes contaminados; falhas no processamento; contaminação cruzada; alimento preparado com muita antecedência; contaminação durante a preparação final; estocagem por muito tempo e consumo de ingredientes crus.

Segundo o "*United State Food and Drug Administration*" – USFDA (1992b, n. p.), os estafilococos estão presentes no trato nasal, no cabelo e pele de 50% ou mais de indivíduos saudáveis. Esta ocorrência é sempre alta para aqueles que convivem com ou quem entra em contato com indivíduos doentes e meio hospitalar. Embora os manipuladores sejam, geralmente, a principal fonte da contaminação alimentar, equipamentos e superfícies também podem ser fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus*. Sabe-se que os equipamentos que entram em contato com os alimentos, podem constituir uma importante fonte de contaminação. Os microrganismos podem persistir na sua superfície, podendo aumentar seu número quando o tratamento de limpeza e desinfecção da equipe tenha sido insuficiente (FRAZIER, 1993, p. 638).

Segundo BRYAN (1988, p. 669), a contaminação cruzada é direta ou indireta de um alimento contaminado para outro alimento. Contaminação cruzada ocorre quando um alimento contaminado é manipulado por pessoas ou quando entra em contato com superfícies de utensílios ou equipamentos, e subsequente as mãos contaminadas da pessoa ou superfície em contato

com um alimento previamente descontaminado ou cozido, contaminam esse alimento.

A manipulação de alimentos cozidos é outro fator vital que leva à contaminação. Reaquecimento é quase mais importante do que o cozimento inicial, pois altos números de microrganismos patogênicos podem ser mortos (ibid., p. 671).

Segundo HAYES (1993, p. 17), os principais fatores ambientais que influem no crescimento bacteriano são alimento, temperatura, umidade, disponibilidade de oxigênio e concentração de hidrogênios.

As bactérias necessitam de alimento não só como fonte de energia, mas também para elaborar seu protoplasma e seus materiais estruturais. As bactérias diferem muito entre si nas suas necessidades nutritivas, mas determinados componentes de seus alimentos são essenciais para o crescimento. Os elementos mais importantes são carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre e fósforo; também são necessários quantidades menores de ferro, magnésio, potássio e cálcio (ibid., p. 17).

A temperatura influi muito nas velocidades de todas as reações químicas ligadas aos processos de crescimento. Por tanto, a temperatura de um meio de cultura ou de um alimento determina a velocidade de crescimento de toda bactéria. A temperatura na qual cresce com maior rapidez um organismo é sua temperatura ótima de crescimento (ibid., p. 18).

A umidade disponível expressada como atividade de água (a_w) é a pressão de vapor da solução (na maioria dos alimentos os solutos de sua água), dividida pela pressão de vapor da água pura. A a_w da água pura é 1,00; a maioria dos meios microbiológicos supera os 0,995; a da carne fresca é 0,99; uma solução saturada de *NaCl* (Cloreto de Sódio) é de somente 0,75 (*ibid.*, p. 19).

As atividades das bactérias, como as dos microrganismos em geral, dependem de suas necessidades de oxigênio. As bactérias que dependem, para sua atividade, do oxigênio livre do ar se denominam aeróbias obrigatórias ou estritas. São poucas as bactérias aeróbias obrigatórias mas muitas das que crescem na superfície dos alimentos como as *Pseudomonas* são consideradas, em geral, como aeróbias. No outro extremo da escala, as anaeróbias obrigatórias só crescem na ausência do oxigênio livre. São poucas as anaeróbias obrigatórias, mas muitas são assim denominadas por que só toleram níveis muito baixos de oxigênio, por exemplo, alguns membros do gênero *Clostridium*. A maioria das bactérias crescem entre estas necessidades extremas de oxigênio e o fazem tanto em ausência, como na presença de oxigênio livre (*ibid.*, p. 20).

Para todos os microrganismos existe uma concentração de hidrogênios (pH) ótimo ao qual seu crescimento é máximo e um pH mínimo que corresponde a acidez máxima que permite seu crescimento. Tem também um pH máximo que corresponde à alcalinidade máxima que permite seu

crescimento. Para a maioria das bactérias o pH ótimo é um pH próximo à neutralidade ou ligeiramente alcalino (6,8-7,5). Algumas preferem um pH mais baixo (4,0-6,0), criando geralmente estas condições, por elas próprias, ao produzirem ácido dos carboidratos. São conhecidas poucas bactérias (por exemplo certas espécies de *Vibrio sp.*) que preferem condições notadamente alcalinas, pH entre 8,5 e 9,0 (ibid., p. 21).

Segundo BRANDLY et al. (1971, p. 323), em uma investigação de surtos causados por estafilococos comprovou que: (1) o serviço de abastecimento apresentava superprodução em sua capacidade de trabalho determinando uma refrigeração inadequada ou carência de refrigeração para todos os alimentos; (2) emprego de ajudantes novos, não familiarizados com o manuseio adequado dos alimentos; (3) preparação prévia e prolongada de alguns dos alimentos com a finalidade de tê-los prontos para uma entrega prolongada; (4) exposição da superfície totalmente estéril da carne pasteurizada fatiada para a entrega; e (5) nos trabalhadores que manusearam os alimentos foram encontrados feridas infectadas nas mãos e/ou braços ou descargas nasais com estafilococos enterotoxigênicos.

Estudos de rastreamento epidemiológico da intoxicação estafilocócica apontam o manipulador de alimentos como elemento incisivo no processo de disseminação do microrganismo. Isto pode ser explicado pelo fato de que os surtos são resultantes de contaminação e crescimento do microrganismo no alimento, após este ter sido submetido a tratamento térmico,

propiciando aí, com a redução da microbiota presente, a produção de enterotoxinas (PEREIRA et al., 1999, p. 49).

2.8 CONDIÇÕES NECESSÁRIAS PARA A TOXINFECÇÃO ALIMENTAR

Segundo ANDERSSON et al. (1995, p. 145), a razão para a toxinfecção é sempre a mesma: pratos com carne contaminada estocados após o cozimento com resfriamento e reaquecimento inadequados ou deficientes.

A temperatura ambiente aliada aos métodos inadequados de processamento (cocção, resfriamento e refrigeração) e a manipulação contaminada (higiene das mãos, equipamentos e utensílios) durante a preparação dos alimentos, aumentam consideravelmente os riscos de ocorrência de surtos de toxinfecções alimentares (BRYAN, 1993, p. 21–22).

PANETTA (1998, p. 8), cita que a maioria dos casos de toxinfecções alimentares, é devida à contaminação dos alimentos através dos manipuladores, os quais podem estar eliminando microrganismos patogênicos sem, contudo, apresentarem sintomas de doença, comprometendo os alimentos por hábitos inadequados de higiene (manipulação dos alimentos com mãos não higienizadas, hábitos precários de higiene pessoal, etc.) ou, até, comprometendo os alimentos através de práticas inadequadas, por desinformação ou revolta.

Tábuas para corte, facas, cortadores, moedores, recipientes e panos de limpeza constituem veículos comuns para a transmissão de toxinfecções alimentares, pois os microrganismos presentes em alimentos crus podem disseminar-se para outros produtos durante a fase de preparação. A contaminação ocorre, preferencialmente, através das mãos dos manipuladores e dos utensílios (GERMANO et al., 1993, p. 7).

Segundo COELHO & VANETTI (1994, p. 27), nos serviços de alimentação, geralmente não é feito o controle das temperaturas de aquecimento do produto durante os processos de cocção e de manutenção do produto aquecido. Após o processo de cocção, algumas vezes o produto é mantido à temperatura ambiente por períodos longos. Sabe-se que o resfriamento inadequado é o fator que mais contribui para a ocorrência de surtos de toxinfecções alimentares e, portanto, da mesma forma que a manutenção a quente, constitui um ponto crítico de controle (ALMEIDA et al., 1995, p. 27).

PEREIRA et al. (1999, p. 49), descrevem que animais podem desenvolver infecções estafilocócicas e, também, muitos carregam o microrganismo nas narinas e outros sítios anatômicos. Porém, a respeito da enterotoxicidade de estafilococos, a mesma é limitada a algumas poucas espécies animais uma vez que estes são considerados menos importantes, frente a realidade de que a maior causa de intoxicação alimentar é decorrente de contaminação de alimentos.

2.8.1 *Staphylococcus aureus*

Para que se apresente um surto de intoxicação alimentar estafilocócica são necessárias as seguintes condições: (1) O alimento deve conter estafilococos que elaborem enterotoxina; (2) o alimento deve ser um meio de cultivo apropriado para que os estafilococos se multipliquem e elaborem a toxina; (3) a temperatura deve ser favorável para que se multipliquem os cocos, e deve transcorrer tempo suficiente para que se produza a enterotoxina e (4) o alimento que contém a toxina deve ser ingerido (FRAZIER, 1993, p. 555). Além disso, é importante observar que os alimentos contaminados por *S. aureus* não apresentam alterações no aspecto e nem alterações no sabor e odor (REED, 1993, p. 642).

2.8.2 *Clostridium perfringens*

As seguintes condições, são necessárias para a presença de um surto de intoxicação gastrointestinal por *Clostridium perfringens*: (1) Que o alimento contenha *C. perfringens* ou esteja contaminado com este microrganismo; (2) que se trate de um alimento cozido e que nele existam condições limitadas para que as bactérias se multipliquem; (3) que se trate de um alimento que não tenha sido refrigerado convenientemente, de forma que o

microrganismo tenha se multiplicado abundantemente por existir no alimento uma temperatura favorável e deixado transcorrer o tempo suficiente para que se multiplique; (4) que o alimento seja consumido sem submetê-lo de novo ao aquecimento, de forma que seja ingerido um elevado número de células bacterianas viáveis e (5) que as células bacterianas esporulem *in vivo* e elaborem a enterotoxina (FRAZIER, 1993, p. 566).

Segundo LABBE (1991, p. 713), a principal causa de todos os surtos de toxinfecções devido ao *C. perfringens* é a falha na refrigeração correta, anteriormente ao cozimento do alimento. Esporos na carne crua podem sobreviver ao cozimento, os quais efetivamente serão ativados no calor para promoverem a germinação quando o produto atingir a temperatura conveniente durante o resfriamento. De fato, ROITMAM et al. (1988, p. 43), descrevem que durante a cocção os esporos de *C. perfringens* naturalmente presentes nos alimentos, ou provenientes de contaminação fecal, direta ou indireta, podem sobreviver nas partes interiores, particularmente quando porções de dimensões acentuadas são submetidas à cocção. Após o tratamento térmico, se o alimento for mantido por períodos prolongados em temperaturas adequadas para o crescimento (principalmente na faixa de 35°C a 45°C), ocorrerá a germinação dos esporos e conseqüente multiplicação da bactéria, favorecida pela existência de condições anaeróbicas no interior das carnes.

Alimentos cozidos e sem oxigenação, resulta em condições anaeróbicas; alimentos cozidos um dia antes ou muitas horas antes de servir e

alimentos conservados em uma temperatura inadequada, nem quente suficientemente, ou gelada suficientemente; estão em condições ideais para uma toxinfecção causada pelo *C. perfringens*. Importante ressaltar que, geralmente, os alimentos contaminados por *C. perfringens* não parecem estragados (REED, 1994, p. 16).

HARES et al. (1998, p. 29), descrevem que os esporos são comuns em alimentos crus e apresentam termo-resistência. O aquecimento elimina o excesso de oxigênio, destrói os outros microrganismos e atua como um choque térmico para os esporos, que podem germinar, formando células vegetativas que podem se multiplicar rapidamente, especialmente em alimentos que tenham um lento resfriamento em ambiente não-refrigerado. Desse modo, nessas condições, um grande número de microrganismos pode ser ingerido com os alimentos.

2.8.3 *Escherichia coli*

Para que se apresentem tanto a enfermidade enterotoxigênica como a enfermidade invasora, é necessária uma elevada dose de *Escherichia coli*. Por conseguinte, para que se tenha lugar uma abundante multiplicação, os alimentos devem estar altamente contaminados ou devem estar incorretamente conservados ou refrigerados. A temperatura ótima de crescimento do

microrganismo é de 37°C, com um intervalo de crescimento de 10°C a 40°C. Seu pH ótimo de crescimento é de 7,0 a 7,5, com um pH mínimo de crescimento de valor 4,0 e um pH máximo de crescimento de valor 8,5. Este microrganismo é relativamente termo-sensível e pode ser destruído com facilidade em temperaturas de pasteurização e também mediante a apropriada cocção dos alimentos (FRAZIER, 1993, p. 570-571).

2.9 PREVENÇÃO DAS TOXINFECÇÕES ALIMENTARES

As bactérias, freqüentemente, provêm do indivíduo que prepara o alimento, razão pelo qual todos aqueles que tiverem fístula, resfriado ou dedo infectado não devem manusear alimentos. Deve-se cuidar para não tossir ou espirrar sobre alimentos, lavar as mãos não só antes de começar a prepará-los mas também após o uso de lenço ou após tocar com as mãos o cabelo ou o rosto (GRISWOLD, 1972, p. 166-167).

ANDRADE (1988, p. 23), examinou 112 doadores sadios e revelou que 40 (35,7%) eram portadores de *S. aureus*, sendo 18 (45%) somente no nariz, três (7,5%) somente na língua, quatro (10%) somente nas mãos, dois (2,5%) somente nas fezes; em associação, quatro (10%) no nariz, língua e mãos, dois (2,5%) no nariz e língua, um (2,5%) no nariz, mãos e fezes, três

(7,5%) no nariz e mãos, um (2,5%) no nariz e fezes, um (2,5%) na língua e fezes, um (2,5%) nas mãos e fezes.

A padronização da higienização das mãos compreende às seguintes etapas: pré-lavagem em água corrente; lavagem das mãos com detergente neutro; enxágüe do detergente e de resíduos com água corrente e imersão das mãos, em solução sanificante por 10 (dez) segundos (CARDOSO et al., 1996a, p. 18).

De acordo com UNGAR et al. (1992, p. 15), as pessoas que manipulam os alimentos desempenham uma função importante na preservação da higiene dos mesmos.

Conforme MINOR & MARTH¹⁰ (apud MARTH, 1985, p. 294), de 30% a 50% de adultos saudáveis transportam *S. aureus* em suas fossas nasais e de 30% a 40% de manipuladores de alimento saudáveis transportam em sua pele e suas mãos. Uma lesão estafilocócica na pele pode providenciar uma fonte importante de estafilococos para contaminação de alimentos.

FRAZIER (1993, p. 636), descreve que para reduzir ao mínimo a contaminação dos alimentos com microrganismos e conseguir uma boa qualidade de conservação para os mesmos, inspeciona-se as matérias primas (limpas, desinfetadas) e examina-se convenientemente a equipe que está em contato com os alimentos.

¹⁰MINOR, T. E. & MARTH, E. H. Staphylococci and their significance in foods. **Elsevier**. Amsterdam. 1976, 297 p.

Para PELCZAR et al. (1981, p. 690), o controle das infecções intestinais, que perdem apenas para as moléstias respiratórias como fonte de desconforto humano, depende, essencialmente, da prevenção da contaminação de alimentos e dos suprimentos de água. Isto pode ser conseguido, efetivamente, por meio de medidas sanitárias, tais como a adequada eliminação dos despejos humanos, a purificação das águas potáveis e o uso de métodos higiênicos na produção e na preparação dos alimentos. Deve ser proibida a participação de portadores de microrganismos enterais nos processos de industrialização e distribuição de alimentos.

FERNÁNDEZ & BERENQUER (1992, p. 62), descrevem que na valorização da qualidade microbiológica de produtos congelados tem que levar em conta que a aplicação de temperaturas inferiores a -20°C produz uma inativação da água disponível, chegando a valores de a_w de 0,84, o que limita o crescimento bacteriano.

Quem manipula alimentos deve ter o hábito de lavar as mãos antes do trabalho, toda vez que evacuar ou urinar, quando sujar as mãos, por exemplo, ao fumar. Deve cortar as unhas rentes, manter os interstícios ungueais bem limpos, lavar as mãos com escova, com uma quantidade suficiente de sabão, em água corrente e não na bacia. Para isso é preciso lhe fornecer todos os meios possíveis para o asseio. Os funcionários precisam dispor de pias, não só nos banheiros, mas também fora deles e na cozinha.

Precisam ter disponíveis sabão, escovas para unhas e material necessário para a secagem das mãos (LEDERER, 1991a, p. 4).

Além disso, é necessário evitar sujar os dedos com saliva, chupando-os ou roendo as unhas; a saliva, por entrar pelas dobras ungueais, torna-se uma fonte de infecção. Mais grave ainda é coçar dentro do nariz; cerca de 40% das pessoas sadias têm estafilococos nas fossas nasais. Evitar, também, tossir e espirrar próximo aos alimentos; usar, em caso de necessidade, um lenço limpo para impedir que os espirros espalhem partículas infectadas nos alimentos (*ibid.*, p. 6).

MORTAJEMI *et al.* (1996, p. 14), afirmam que a fim de evitar a contaminação de alimentos, deve-se manter os alimentos fora do alcance de insetos, roedores e outros animais, pois estes podem transmitir microrganismos patogênicos e são fontes potenciais de contaminação dos alimentos. Além de manter-se perfeitamente limpas todas as superfícies que se utilizem para preparar alimentos. Não se esquecendo que quaisquer restos de alimentos ou migalhas são possíveis reservatórios de germes e podem atrair insetos e outros animais. O lixo deve ser guardado em locais seguros e resguardados e desprezado o mais rápido possível.

As intoxicações por *Staphylococcus aureus* são comuns no verão, principalmente pelo uso de produtos de pastelaria, saladas, molhos, derivados do leite e carne mal preparadas, por isso a refrigeração dos alimentos combinada com a higiene é atualmente o melhor controle (GAVA, 1979, p. 81).

No caso da *Escherichia coli*, os cuidados especiais devem ser tomados com as águas de abastecimento, com a higiene dos operários que manipulam alimentos e com a limpeza e desinfecção do equipamento, instalações e instrumental em geral. É igualmente importante a cocção adequada e a guarda dos alimentos sob refrigeração, depois de manipulados em atmosfera controlada (PARDI et al., 1995, p. 308).

De acordo com RIEDEL (1992, p. 71), para evitarmos a infecção por *Escherichia coli* enteropatogênica, como medidas de controle, devemos resfriar os alimentos rapidamente em porções pequenas; cozinhar intensamente; praticar higiene pessoal e aplicar os princípios de saneamento básico.

Segundo GAVA (1979, p. 80), as carnes preparadas (ensopadas, assadas, etc.) são os veículos principais de tais *C. perfringens*, devendo como medida de controle ser feita a cocção do alimento imediatamente antes do consumo e manter o alimento guardado em baixas temperaturas.

Do mesmo modo, LABBE (1991, p. 713), descreve que molhos, caldos e grandes peças de carne devem ser aquecidos a uma temperatura interna mínima de 75°C imediatamente antes de servir para destruir as células vegetativas. Carnes cozidas devem ser mantidas acima de 60°C ou abaixo de 10°C.

LIBBY (1975, p. 287), descreve que a prevenção de doença provocada por *C. perfringens* depende da refrigeração do alimento inteiro

dentro de três horas após o cozimento. Todas as partes do alimento deve ser resfriada prontamente, não excedendo 10°C neste período.

Segundo PARDI et al. (1995, p. 337), pode-se evitar ou reduzir a contaminação por *Staphylococcus aureus*, com a adoção de medidas gerais de higiene, como a do ambiente nos estabelecimentos industriais, a do equipamento e instrumental em geral, a do pessoal e a do transporte no recinto da indústria evitando-se os maus hábitos e a ocorrência de resfriados, feridas e outras fontes de microrganismos. Devem ser tomados cuidados especiais, inclusive com o pessoal sadio, quanto à higiene das mãos que deverá ser rotineira.

SOUSA & BRADACZ (1997, p. 28), apresentaram as operações, identificando os pontos de controle e os pontos críticos de controle nos pratos protéicos, descrevendo, os perigos envolvidos em cada operação, as medidas de controle e o monitoramento necessários (Tab. 7).

Para se evitar a intoxicação por *Staphylococcus aureus*, segue-se as seguintes medidas de controle: resfriar os alimentos rapidamente em porções pequenas; praticar higiene pessoal, principalmente aos doentes da manipulação (diarréia, resfriados, cortes infectados); evitar tocar alimentos cozidos com as mãos; desinfetar os equipamentos; cozimento intenso; pasteurização (destrói os organismos, mas não a toxina); preparar os alimentos no mesmo dia do consumo sempre que possível (RIEDEL, 1992, p. 69).

Segundo ROITMAM et al. (1988, p. 46), a prevenção da intoxicação estafilocócica em alimentos pode ser alcançada pelo controle da sua contaminação, mediante práticas adequadas de higiene e sanificação industrial, principalmente no que concerne à manipulação dos produtos. Além disso, pela refrigeração adequada dos alimentos susceptíveis à contaminação e proliferação de *S. aureus*, consegue-se manter as populações em níveis reduzidos, minimizando-se, portanto, os riscos de intoxicações. Finalmente, pelo aquecimento dos alimentos, a bactéria é facilmente destruída, embora a enterotoxina, porventura presente, não seja sensivelmente afetada em temperaturas abaixo de 100°C.

Mesmo em produtos submetidos a tratamentos térmicos acima de 100°C, deve-se tomar precauções especiais no sentido de se evitar sua recontaminação após o resfriamento, seja pelo manuseio inadequado ou contato com equipamentos, utensílios e superfícies contaminadas. Como norma geral de segurança, alimentos preparados que oferecem condições para a multiplicação desta bactéria não deverão ser mantidos em temperaturas na faixa de 15°C a 60°C por períodos superiores a duas horas (ibid.).

A intoxicação alimentar por *Clostridium perfringens* pode ser evitada se seguirmos as seguintes medidas de controle: esfriar alimentos rapidamente em pequenas porções; higiene pessoal; manter os alimentos acima de 55°C; usar sal suficiente na cura; dispor de esgoto adequadamente,

reaquecer as sobras a 75°C. O cozimento intenso destrói células vegetativas, mas não esporos resistentes ao calor (RIEDEL, 1992, p. 69).

Segundo PARDI et al. (1995, p. 345), a proteção da carne contra o crescimento do *Clostridium perfringens* é semelhante à utilizada contra a maioria dos microrganismos patógenos. Ela se baseia no seu reduzido crescimento a temperatura abaixo de 15°C, ressaltando-se que a temperatura crítica de conservação dos produtos cárneos está abaixo de 5°C. Na alimentação comunitária ou no âmbito doméstico e, sob certos aspectos, também na indústria, os alimentos, cozidos sempre acima de 65,5°C, desde que não venham a ser consumidos ou processados imediatamente, terão sua temperatura rebaixada a pelo menos 4,4°C.

ARRUDA (1997, p. 96-99), descreve alguns itens importantes para a higiene pessoal, do local de trabalho e com os alimentos:

- (1) O manipulador deve dirigir-se ao vestiário, tomar banho e usar exclusivamente a sua toalha pessoal, no início da jornada;
- (2) Usar uniforme completo;
- (3) Não usar perfumes e/ou desodorantes com cheiro forte;
- (4) Manter o cabelo curto e aparado. No caso de mulher, deve tê-lo preso sob a touca;

(5) Manter as unhas curtas e aparadas, jamais esmaltadas e no caso dos homens com barba, mantê-la aparada;

(6) Limpar, cobrir e proteger qualquer ferimento;

(7) Manter os sapatos e botas limpos;

(8) Higienizar as mãos a cada troca de atividades, após o uso do sanitário, após fumar, antes de tocar qualquer alimento, ao tocar em lixo e sujeiras, ao manusear dinheiro ou após outras atividades que impliquem contaminação das mãos;

(9) Evitar fumar, comer ou mascar goma ou fumo em área de serviço;

(10) Não usar acessórios e bijuterias;

(11) Usar luvas descartáveis, sempre que indicado e não dispensar a lavagem freqüente das mãos. A luva deve ser de material apropriado e substituída a cada troca de função, ou antes, se necessário, de forma que se apresente sempre em boas condições sanitárias e de uso;

(12) Os utensílios (facas, tábuas, panelas, louças), equipamentos (geladeiras, *freezers*, câmaras frias, fogão, cortadores) e o local de preparação dos alimentos devem ser mantidos rigorosamente higienizados;

(13) Os pratos, panelas, talheres, copos, devem ser manuseados pelos cabos, beirais e pegadores, evitando-se tocar nos locais que entram em contato com os alimentos;

(14) Após o processo de polimento, os pratos e os talheres devem permanecer cobertos;

(15) As pias para higienização das mãos não devem ser usadas para a higienização de alimentos, o mesmo vale para a situação inversa;

(16) Os utensílios (facas, tábuas, escumadeiras) devem ser higienizados com detergente neutro e solução de Hipoclorito de Sódio a 200 ppm de Cloro ativo sempre que houver mudança de alimento manuseado;

(17) Os recipientes com alimentos nunca devem ser colocados diretamente sobre o chão. Nesses casos deve-se utilizar estrados ou bancadas;

(18) Não é permitido o uso de toalhas de pano na cozinha. Deve-se usar apenas papel toalha descartável;

(19) O lixo deve ser mantido em latões de lixo tampados e removidos sempre que estiverem cheios;

(20) Não é permitida a permanência de animais nas áreas de preparo e armazenamento de alimentos;

(21) Todos os alimentos devem ser mantidos cobertos, sempre, com tampas ou filme plástico transparente;

(22) Os alimentos prontos devem ser manipulados somente com pinças, garfos e travessas ou com as mãos protegidas com luva descartável;

(23) Os alimentos que caírem no chão devem ser imediatamente desprezados;

(24) Os funcionários não devem falar, tossir ou espirrar sobre os alimentos e utensílios;

(25) Os funcionários devem usar exclusivamente o refeitório para qualquer refeição, evitando usar as áreas de serviço para esta finalidade;

(26) Os alimentos crus e cozidos devem ser mantidos separados, em todas as fases de armazenamento, preparo, cozimento e ao servir;

(27) Os alimentos devem ser mantidos em temperatura ambiente somente o mínimo de tempo necessário (no máximo 30 minutos);

(28) As temperaturas de risco devem ser evitadas. Os alimentos devem ser conservados abaixo de 4°C ou acima de 60°C;

(29) As portas das geladeiras e das câmaras frias devem ser mantidas bem fechadas;

(30) Os alimentos que sobrarem nas latas devem ser transferidos para recipientes de plástico branco atóxico ou inox e cobertos com tampas ou filme plástico identificados através de etiquetas. O prazo de validade dos

enlatados, após abertos. É de 24 horas, desde que armazenados a, no máximo, 6°C;

(31) Na cocção deve-se atingir, no interior do alimento, 74°C por cinco minutos dentro do intervalo máximo de duas horas;

(32) No reaquecimento, o interior do alimento deve atingir, no mínimo, 74°C por cinco minutos, desde que a cocção inicial também tenha atingido os critérios preconizados.

A obtenção de uma matéria-prima de origem conhecida e de boa qualidade é essencial, pois dessa maneira os produtos resultantes do seu processamento apresentarão as características desejáveis. O descongelamento e o resfriamento inadequados dos alimentos favorecem o crescimento e multiplicação de microrganismos, além de outras reações que tornarão os produtos inaceitáveis. Cuidados com a higiene de equipamentos e utensílios devem ser divulgados aos funcionários, sendo também importante a conscientização dos empresários sobre os benefícios que o fornecimento de produtos de qualidade higiênico-sanitária satisfatória trarão, não somente para os consumidores, como para os próprios industriais (GONÇALVES, 1998, p. 44).

Sob o aspecto de Saúde Pública a água potável deve estar isenta de contaminação por microrganismos do grupo coliforme, portanto, é recomendada a determinação periódica do índice colimétrico e a contagem total (contagem de heterotróficos aeróbios mesófilos viáveis) em placas já que um aumento repentino do número de microrganismos num poço ou manancial

pode indicar contaminação, funcionamento deficiente de Estação de Tratamento de Água ou mesmo informar sobre possível qualidade da água de um novo manancial de abastecimento (HOFFMANN *et al.*, 1997, p. 47).

O tratamento convencional usado para a água, sempre que exista dúvida com relação a qualidade microbiológica, é a cloração, cuja concentração vai depender da qualidade e quantidade dos minerais dissolvidos na água, assim como o grau de contaminação (*ibid.*).

2.9.1 Sanificação - Uso de sanificantes

De acordo com SCHILLING (1998, p. 107-108), cada substância sanificante tem características próprias, e por decorrência, uma concentração e técnica de uso peculiares:

(1) Cloro: eficaz contra bactérias em geral, e moderadamente eficaz contra vírus, mofos e leveduras, e esporos. A água sanitária para funcionar como bactericida eficaz, precisa ter pelo menos 2% de cloro. Os alimentos devem ser lavados em água corrente e a água previamente filtrada, e só depois entrarem em contato com o cloro, devido a "demanda do cloro", pois o cloro reage prontamente na presença de matéria orgânica esgotando sua ação bactericida;

(2) Iodo: eficaz contra bactérias e moderadamente eficaz contra fungos, mofo, leveduras e esporos. Apresenta alto custo. O material a ser sanitizado deve ter recebido uma pré-lavagem e limpeza adequada;

(3) Quaternário de Amônio: eficaz apenas para bactérias Gram positivas, fungos, mofo e leveduras, sendo moderadamente eficaz para as Gram negativas, e não age sobre vírus. Tem efeito residual e portanto exige que as superfícies sejam enxaguadas antes de entrar em contato com os alimentos;

(4) Ácido Peracético: eficaz contra bactérias, vírus, fungos, mofo e leveduras. Não tem efeito residual, podendo a superfície ser usada logo após a sanitização, porém pode exalar vapores se for manuseado incorretamente;

(5) Álcool: a formulação aquosa a 70% de álcool é um razoável bactericida, ao fazer evaporar a água residual das superfícies, além da concentração alcoólica. O preparo é feito a partir do álcool 96°GL, adicionando 250 mL de água destilada em 750 mL de álcool 96°GL;

(6) Vinagre: eficaz na sanitização para o *Vibrio cholerae* em solução de 4% a 6%.

Todos os produtos de sanitização podem provocar o aparecimento de microrganismos resistentes após um certo tempo, por isso recomenda-se a alternância do seu uso. A rotação do Cloro ou Iodóforo, seguida por

Quaternário de Amônio, alternados por mês, e a cada quatro meses introduzir o Ácido Peracético, tem se revelado muito eficaz (*ibid.*, p. 108).

Nas indústrias de alimentos é freqüente o uso de germicidas ou sanificantes para a desinfecção de mãos de manipuladores, de matérias-primas e de ingredientes. A redução de microrganismos da pele em virtude da ação de germicidas tem sido denominada de degermação e, mais recentemente, como desinfecção higiênica das mãos, distinguindo-se da desinfecção cirúrgica. Enquanto na primeira se espera a remoção ou morte da microbiota transiente, na Segunda tenciona-se a uma ação sobre as microbiotas transiente e residente (CARDOSO *et al.*, 1996a, p. 17).

HOFFMAN *et al.* (1995, p. 34), demonstraram que entre os desinfetantes estudados, o formol, na forma diluída, foi o que apresentou uma maior eficácia frente à maioria dos microrganismos testados. Alguns dos desinfetantes foram mais ativos na forma diluída enquanto que outros somente na forma concentrada, portanto a atividade de um desinfetante depende também do microrganismo sobre o qual atua.

CARDOSO *et al.*, (1996b, p. 26 e 28–29), compararam a eficiência de produtos sanificantes e um sabão neutro (*Diverdet*[®], da Diversey Wilimington SA, em solução aquosa a 2%) para mãos, sobre suspensões bacterianas de *E. coli* e de *S. aureus* inoculados em mãos de voluntários, sob condições padronizadas. Para a suspensão de *E. coli*, todos os produtos sanificantes apresentaram redução superior a 90%, exceto o neutro que atingiu

0,84 RD (Reduções Decimais). Os melhores produtos foram o *Irgasan DP-300*[®] (derivado fenólico da Diversey SA, sem diluição, por se tratar de detergente sanificante já previamente preparado), a *Clorhexidina*[®] (derivado biguanididigluconato, da RDM Farmacêutica SA, em solução aquosa a 0,05%) e o iodóforo (*Bac Stop*[®], da Diversey Wilimington SA, em solução aquosa a 0,4%), com reduções decimais de 1,79; 1,40 e 1,38, respectivamente. Para a suspensão de *S. aureus*, foram verificadas suspensões distintas das obtidas para a cultura Gram negativa, variando de 0,43 a 1,30 RD. Os melhores produtos foram o iodóforo (*Bac Stop*[®]), *Clorhexidina*[®] e *Irgasan DP-300*[®].

Segundo GAVA (1979, p. 90-91), a sanificação visa eliminar os microrganismos presentes nos equipamentos e não removidos após a limpeza normal, podendo ser usado para isso a sanificação por meios físicos, como o uso de calor (vapor, água quente e ar quente) ou radiação ultravioleta:

(1) Vapor: jatos de vapor a 77°C durante 15 minutos ou a 93°C durante cinco minutos ou ainda um minuto pelo uso do vapor direto;

(2) Água Quente: recomenda-se uma exposição de dois minutos a 77°C no caso de xícaras e utensílios e de cinco minutos a 77°C no caso de equipamentos de processamento de alimentos;

(3) Ar Quente: exposição durante 20 minutos à temperatura de 82°C;

(4) Radiação Ultravioleta: radiações com comprimento de onda na faixa de 240 a 280 nm (nanômetros) são germicidas e podem, após um tempo de dois minutos, destruir microrganismos superficiais. São usadas em certas embalagens e na "*esterilização*" de ambientes. Lâmpadas de vapor de mercúrio com baixa pressão são comumente empregadas, emitindo 90% de radiações com 254 nm.

2.10 PADRÕES MICROBIOLÓGICOS

Os limites e tolerâncias para as diferentes classes de produtos alimentícios obedeceram os critérios e padrões especificados na portaria 451 de 19 de setembro de 1997. Os critérios e respectivos limites para produtos cárneos são os descritos na Tabela 8 (BRASIL, 1998, p. 5).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MÉTODO DE COLETA DE AMOSTRAS

Foram analisadas 110 (cento e dez) amostras, distribuídas em 22 (vinte e duas) amostras de cada um dos tipos que se segue, carne bovina, servida nas refeições escolares (merenda escolar) antes da cocção; após cocção; e *swab* (zaragatoa) das mãos do funcionário responsável pela preparação da carne e utensílios de cozinha (faca de corte de carne e tábua para corte) antes do seu uso, respectivamente, em cada coleta. Sendo 48 (quarenta e oito) amostras de colégios municipais de Tanguá, estado do Rio de Janeiro; 20 (vinte) amostras de um colégio pertencente a rede Estadual de Ensino do Rio de Janeiro, localizado no município de Itaboraí; e 20 (vinte) amostras de um colégio localizado no município de São Gonçalo, também pertencente a rede Estadual de Ensino do Rio de Janeiro (Tabela 9).

Ao mesmo tempo em que eram feitas as coletas das amostras de carne, foram coletadas amostras da água, que se utiliza no preparo das refeições, diretamente das torneiras do interior das cozinhas dos colégios, totalizando 110 (cento e dez) amostras.

Os métodos empregados foram baseados nos recomendados pela Associação Americana de Saúde Pública – “*American Public Health Association*” – APHA (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992, 1912 p.).

3.1.1 Amostras de carne antes e após a cocção

As amostras de carne (antes e após a cocção) foram retiradas, em condições de esterilidade, de três diferentes pontos para que se obtivesse melhor representatividade, e acondicionadas individualmente em sacos de polietileno de baixa densidade com fecho hermético, mantidas em um recipiente isotérmico, com gelo, até a chegada ao laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF); onde foram analisadas.

Da amostra, após a homogeneização manual, foi retirada e pesada uma alíquota de 25 g diretamente em saco para *Stomacher*[®], conforme normas laboratoriais, e adicionada de 225 mL de Solução Salina Peptonada (SSP) a 0,1% e homogeneizada em *Stomacher*[®] por dois minutos, obtendo assim a diluição 10^{-1} . A partir desta, após homogeneização, com auxílio de uma pipeta transferiu-se 10 mL da solução para frasco contendo 90 mL de SSP de

modo a obter diluição de 10^{-2} e a partir desta diluição utilizando-se o mesmo procedimento, foi obtido a diluição de 10^{-3} .

3.1.2 Amostras de superfícies

Para coleta de amostras de superfícies, foram utilizados *swabs* (zaragatoas) esterilizados que estavam contidos em tubos de ensaio contendo SSP a 0,1%. A partir desta solução executaram-se as diluições.

Os *swabs* foram friccionados nas regiões palmar, dorsal, entre dedos e leito ungueal das mãos do manipulador e nas superfícies da tábua para corte de carne imediatamente antes da sua utilização.

O transporte, dos tubos com os *swabs*, também ocorreu em recipiente isotérmico, com gelo.

Dos tubos foram retirados 10 mL da solução para frasco contendo 90 mL de SSP de modo a obter diluição de 10^{-1} e a partir desta diluição, utilizando-se o mesmo procedimento, foram obtidas as diluições de 10^{-2} e 10^{-3} .

3.1.3 Amostras de água de abastecimento

Para a coleta de amostras de água de abastecimento foram utilizados frascos de vidro esterilizados, com capacidade de 250 mL com boca larga e rolha esmerilhada, adicionado de 0,02 g (ou 1 mL de solução a 2%) de Tiosulfato de Sódio para cada 2/3 (dois terços) do frasco (aproximadamente 170 mL). Para efeito de delineamento experimental, determinou-se que a proporção observada foi de uma análise de água para cada amostra de carne. A água foi coletada da torneira da cozinha após três minutos de escoamento, em frasco de 250 mL contendo Tiosulfato de Sódio, sendo transportado em recipiente isotérmico, com gelo. Após a homogeneização do conteúdo, transferiu-se por auxílio de pipeta, 1 mL da amostra para tubo de ensaio contendo 9 mL de SSP a 0,1% de modo a obter uma diluição de 10^{-1} . Em seguida, retirou-se 1 mL desta diluição 10^{-1} transferindo-a para outro tubo contendo 9 mL de SSP a 0,1%, obtendo assim a diluição de 10^{-2} . Repetiu-se o mesmo método com a diluição de 10^{-2} , obtendo-se assim a diluição de 10^{-3} .

As análises foram para enumeração de Número Mais Provável (NMP) de coliformes total e fecal e contagem padrão em placa para aeróbios mesófilos heterotróficos.

3.2 ANÁLISES LABORATORIAIS

3.2.1 Enumeração de coliformes fecais pelo método do Número Mais Provável (NMP) e identificação de *Escherichia coli*

Seguindo-se a metodologia usada por HITCHINS et al. (1992, p. 325-369), para cada amostra corresponderam três séries de três tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), para os quais foi transferida uma alíquota de 1 mL, com o auxílio de uma pipeta, de cada diluição de SSP correspondente e incubados à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$, reincubando os negativos por mais $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. A partir de cada tubo positivo de LST caracterizado pela formação de gás no interior do tubo de *Durhan* e turvamento do meio, transferiu-se por meio de alçada, uma alíquota para três tubos correspondentes contendo Caldo para *Escherichia coli* (EC), para contagem de coliformes fecais, incubando-os em banho-maria com circulação de água à $45,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}/24 \pm 2 \text{ h}$. Os tubos positivos do Caldo EC foram conferidos nas tabelas de NMP para coliformes fecais, de acordo com PEELER et al. (1992, p. 112). O resultado obtido como NMP/g da amostra, permitiu avaliar a qualidade microbiológica da água, conforme os padrões estabelecidos pela portaria 451 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1998, p. 13).

Dos tubos positivos do Caldo EC foram transferidas, com o auxílio de alça de platina ou de níquel cromo, alíquotas que através de estrias foram inoculadas, por esgotamento, em placas correspondentes contendo meio Ágar Eosina Azul de Metileno, segundo Levine (EMB), incubadas à $35^{\circ}\text{C}/24 \pm 2 \text{ h}$. Ao

ocorrer crescimento de UFC típicas, nucleadas com centro negro e brilho verde metálico, estas foram transferidas de três a cinco unidades de cada placa por meio de agulha para o meio Ágar Padrão para Contagem (PCA), inclinado em tubo, à 35°C/18-24 h. Na ausência de UFC típicas, porém semelhantes, também foi feita a repicagem para o PCA. Terminada a incubação, transferiu-se alíquotas por meio de alçada para meios adequados à realização das provas bioquímicas para a caracterização da *E. coli*.

3.2.1.1 Identificação bioquímica

Durante os testes adicionais para a identificação bioquímica da *Escherichia coli*, utilizou-se uma cepa padrão de *E. coli* O157:H7 PHLS ('*Public Health Laboratory Service*') E-40705 (Figura 5), pertencente ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária (UFF).

3.2.1.1.1 Teste do Indol

Usou-se o Caldo Tripton a 1%, incubando-o à 35°C/24 ± 2 h. Adiciona-se 5 gotas de reativo de *Kovacs* e a reação positiva é caracterizada pela formação de anel vermelho na superfície do meio (Fig. 6). Isto ocorre

devido a reação do Triptofano formando o Indol (produção de enzima triptofanase). As cepas de *E. coli* são Indol positivo ou negativo.

3.2.1.1.2 *Teste de Voges-Proskauer (VP) & Vermelho de Metila (VM)*

Inoculou-se, com uma alçada de platina, cultivo do PCA para Caldo, para Teste VM/VP. Incubou-se à 35°C/48 ± 2 h de onde foi retirada uma alíquota de 1 mL para o teste do acetilmetilcarbinol ou Voges-Proskauer. Após adição de 0,6 mL de alfa-naftol a 5% e 0,2 mL de KOH a 40%, com leitura após 15 a 30 segundos, a reação positiva é caracterizada pelo aparecimento da cor rósea ou vermelha, sendo o restante reincubado por mais 48 h para o teste do vermelho de metila.

O aparecimento de cor vermelha no Teste do VP (Fig. 7) indica prova positiva, sendo que as cepas características de *E. coli* são VP negativas. Para o Teste do VM (Fig. 8), adicionam-se 2 a 3 gotas de vermelho de metila, com leitura após 20 a 30 minutos, ficando o meio vermelho (positivo) ou amarelo (negativo), as cepas de *E. coli* são positivas (SILVA *et al.*, 1997, p. 36-37).

3.2.1.1.3 *Citrato de Simmons*

Os subcultivos de PCA foram estriados no bisel dos tubos contendo Ágar Citrato de Simmons inclinado e incubados à 35°C/96 h, sendo positivo quando ocorresse viragem da cor verde para azul (Fig. 9). A viragem da cor verde para a cor azul é devido a produção de citratase que desdobra o citrato e amônia, pois o microrganismo usa o citrato como única fonte de carbono, caracterizando prova positiva, devido a produção principalmente de acetato. As cepas de *E. coli* são citrato negativo.

3.2.1.2 Coloração pelo método de Gram

A partir do PCA de 18-24 h de incubação. São característicos de *E. coli*, os bastonetes Gram negativos sem esporos, tingidos pela Fucsina ou Safranina.

3.2.1.3 Testes de produção de gás a partir da Glicose, H_2S , Urease e Triptofano

Desaminase (meio EPM)

TOLEDO et al. (1982a, p. 309), propuseram um meio para identificação de enterobactérias (meio EPM) que informa quanto aos testes de

produção de gás a partir da glicose, $\mathcal{H}_2\mathcal{S}$, urease e triptofano desaminase (Fig. 10).

Com o auxílio de um estilete de platina, foi semeada toda a superfície do meio e a base com uma picada central até o fundo do tubo. Incubou-se a 37°C durante 20-24 horas (ibid., p. 311).

O meio EPM fornece, em um único tubo, informações quanto aos testes de produção de gás a partir da fermentação da glicose, $\mathcal{H}_2\mathcal{S}$ e urease 1-triptofano desaminase. A produção de gás, $\mathcal{H}_2\mathcal{S}$ e urease são observadas na base do meio, enquanto que a produção de 1-triptofano desaminase é observada na superfície. As bactérias que fermentam glicose acidificam o meio na base, virando o indicador, azul de bromotimol, para amarelo. Se a fermentação da glicose ocorre com produção de gás, observa-se formação de bolhas. Quando a bactéria produz urease há alcalinização do meio e o indicador vira para azul ou amarelo-esverdeado, neste último caso quando a reação é fraca. Quando há produção de $\mathcal{H}_2\mathcal{S}$ a base do meio torna-se preta. Coloração verde-escuro na superfície indica produção de 1-triptofano desaminase (ibid.).

Para o gênero *Escherichia*, a superfície torna-se azul ou amarela, pois é incapaz de produzir 1-triptofano desaminase; a base amarela, indicando fermentação de glicose; produção de $\mathcal{H}_2\mathcal{S}$ é negativa e produção de gás poderá ser positiva ou negativa (ibid., p. 313).

Nos testes do meio EPM para *E. coli* os resultados esperados são urease negativa; 1-triptofano negativo; fermentação da glicose positiva.

3.2.1.4 Testes de Motilidade, Indol e Lisina (meio MILi)

TOLEDO et al. (1982b, p. 230), propuseram um meio para identificação de enterobactérias, denominado MILi, que informa quanto aos testes de motilidade, produção de indol e lisina descarboxilase (Fig. 11).

Com uma agulha de platina, inoculou-se o meio por uma picada central, até a base do tubo. Após 20-24 horas de incubação a motilidade foi detectada pela turvação total do meio ou pela observação de crescimento além da linha de inoculação. Em caso de amostras imóveis, o crescimento restringiu-se à linha de inoculação, enquanto o restante do meio permaneceu límpido. Devido a fermentação da glicose as enterobactérias viram a base do MILi para amarelo; as enterobactérias que descarboxilam a lisina revertem a cor do meio para roxa ou roxo-acinzentada. Cor amarela nítida na base com uma banda roxa no topo indica reação negativa para lisina descarboxilase. Após a leitura dos testes de motilidade e lisina, verificou-se a produção de indol adicionando-se três a quatro gotas de reagente de Kovacs ao meio, agitando-se suavemente o tubo. Formação de anel vermelho, ou róseo, na superfície do meio indica presença de indol; anel de cor amarela indica reação negativa (ibid., p. 231).

3.2.2 Contagem de *Staphylococcus aureus*

O método descrito a seguir é baseado em LANCETTE & TATINI (1992, p. 533-550). De cada diluição inicial retira-se, com o auxílio de uma pipeta, uma alíquota de 1 mL que é distribuída na placa pelo método *spread plate*, usando o bastão de vidro (*Drigalsky*), em três placas respectivamente (0,4; 0,3 e 0,3 mL) contendo o meio seletivo indicador Ágar Baird Parker (ABP), incubadas à 35°C-37°C/46 h \pm 2 h após a absorção da amostra pelo meio.

Porém, para praticidade, agilidade e economia, nas análises laboratoriais, o *spread plate* foi feito em apenas duas placas contendo ABP, sendo uma com 0,2 mL e outra com 0,3 mL de cada diluição. Para a contagem, foram feitos os cálculos normais, sendo o resultado final multiplicado por dois.

Duas ou mais UFC características, isto é, de no máximo 1,5 mm, cor negra ou cinza escuro, lisas, convexas, podendo apresentar zona opaca e/ou halo claro em torno, foram selecionadas de placas com ABP, contendo entre 20 e 200 UFC. A UFC do *S. aureus* apresenta-se com estas características pois, ao crescer, reduz o Telurito de potássio a Telurito metálico e hidrolisa a Lipovitelina, que é uma lipoproteína, encontrada na gema do ovo. O halo opaco aparece devido ao precipitado de carbonato de cálcio.

As UFC selecionadas foram inoculadas em tubos correspondentes contendo cerca de 2 mL de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e após

homogeneização cuidadosa foi alçada uma alíquota para o meio inclinado de Trypticase de Soja (TS) ou Ágar Nutriente (AN), incubando os dois meios à 35°C-37°C/18-24 h.

Para o teste da coagulase, transferiu-se 0,2 mL de cada tubo de BHI para tubos de 10 x 100 mm e adicionou-se 0,2 mL de plasma de coelho. Incubou-se em banho-maria à 35°C-37°C e, logo depois observou-se a formação de coágulo nas primeiras 6 h, de hora em hora. Reações de nível 3 e 4 são confirmativas para *S. aureus* devendo as de níveis 1 e 2 serem submetidas a testes adicionais.

O resultado foi expresso em UFC/g em função da diluição, do número de UFC típicas contadas e o percentual de confirmadas. Exemplo 1: diluição 10^{-2} , 30 UFC típicas, cinco submetidas à confirmação, três confirmadas (60%). O cálculo foi feito da seguinte forma, $30 \times 10^2 \times 10 \times 0,6 = 1,8 \times 10^4$ UFC/g. Exemplo 2: diluição 10^{-2} , 30 UFC suspeitas (20 típicas e 10 atípicas), 10 submetidas à confirmação (cinco típicas e cinco atípicas), sete confirmadas (cinco típicas = 100% e duas atípicas = 40%). Calculou-se da seguinte maneira, $(20 \times 10^2 \times 10 \times 1,0) + (10 \times 10^2 \times 10 \times 0,4) = 2,4 \times 10^4$ (SILVA et al., 1997, p. 57).

3.2.2.1 Testes adicionais

Durante os testes adicionais para a confirmação bioquímica da presença do *Staphylococcus aureus*, utilizou-se uma cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC ("American Type Culture Collection") 25923 (Figura 5), pertencente ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária (UFF).

3.2.2.1.1 Coloração pelo método de Gram

Para a coloração pelo método de Gram, partiu-se do BHI antes do teste da catalase. Sendo característicos de *S. aureus*, os cocos Gram positivos não esporulados, tingidos pelo Cristal Violeta.

3.2.2.1.2 Catalase

Estriou-se, por meio de alça, uma alíquota obtida do BHI para Ágar Nutriente (AN), inclinado, e após incubação à 35°C-37°C/24 h foram adicionadas gotas de água oxigenada a 3% e observando a efervescência. O teste de catalase para *S. aureus* é positivo.

3.2.2.1.3 DNase

A partir do BHI fez-se três estrias em placa contendo Ágar DNase e logo depois, incubou-se à 35°C-37°C/24 h. Após este tempo, cobriu-se as UFC com solução de Azul de Toluidina 0,1%. Ao crescer a bactéria despolimeriza o DNA precipitando-o que em contato com o Azul de Toluidina o que determina o aparecimento de halo róseo em torno das estrias (Fig. 2). O *S. aureus* é DNase positiva.

3.2.2.1.4 Oxidação e fermentação de glicose e manitol

O *S. aureus* utiliza glicose e normalmente manitol anaerobicamente. Preparou-se tubos com meio de *Hugh-Leifson* para as provas de Oxidação/Fermentação (O/F) com 1% de glicose e com 1% de manitol, para cada cultura a ser testada. Inoculou-se as culturas por picada, cobriu-se a superfície do meio, servindo assim para a prova de fermentação, com óleo mineral estéril ou vaselina líquida e outras não foram cobertas com o óleo, para a prova de oxidação, incubou-se à 35°C-37°C/24 h. O *S. aureus* é positivo para O/F glicose e O/F manitol (Fig. 3).

3.2.2.1.5 *Termonuclease*

O BHI foi submetido à fervura em banho-maria por 15 minutos e orifícios previamente preparados em Ágar de Azul Toluidina-DNA (TBD), contidos em placas, foram preenchidos com o BHI após a fervura deste. Após incubação à 37°C/4 h ou 50°C/2 h em câmara úmida, verificou-se a formação de halo róseo em torno dos orifícios (Fig. 1), em caso de positividade (foram usadas cepas padrão positiva e negativa).

A Termonuclease testa a capacidade de certos microrganismos de produzirem DNase. Esta nuclease é uma das características marcante para a identificação de *S. aureus*. Embora haja vários microrganismos produtores desta nuclease, a estabilidade da enzima produzida pelo *S. aureus* é excepcional, uma vez que, esta não perde a atividade quando submetida a ebulição por 30 minutos (SIQUEIRA, 1995, p. 126).

3.2.2.1.6 *Teste de Voges-Proskauer (VP)*

Inoculou-se uma alçada do BHI em Caldo para Teste VM/VP. Incubou-se à 35°C/48 ± 2 h de onde foi retirado uma alíquota de 1 mL para o teste do acetilmetilcarbinol ou *Voges-Proskauer*, que se caracteriza como

positivo pela adição de 0,6 mL de alfa-naftol a 5% e 0,2 mL de KOH a 40%, com leitura após 15 a 30 segundos aparecendo cor rósea ou vermelha.

O aparecimento de cor vermelha no Teste do VP indica prova positiva (Fig. 4) para *Staphylococcus aureus*, diferenciando-o dos *S. intermedius* e *S. hyicus*, já que estes são VP negativo, segundo BOURGEOIS et al. (1994, p. 69).

3.2.3 Contagem de *Clostridium perfringens*

O método de identificação para o *C. perfringens*, foi baseado em LABBE & HARMON (1992, p. 623-635). A partir do SSP, correspondente, inoculou-se 1 mL, com pipeta, em placas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), respectivamente. Verteu-se nas placas inoculadas, cerca de 5,0 a 15,0 mL de Ágar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS), previamente fundidos e resfriados à 45°C, mantidos em banho-maria, até o momento do seu uso (técnica *pour plate*). Misturou-se o inóculo com o SPS movimentando-se suavemente as placas, numa superfície plana, em movimentos na forma de oito ou círculo, de 8 a 10 vezes no sentido horário e de 8 a 10 vezes no sentido anti-horário. Esperou-se a solidificação do meio e depois adicionou-se mais uma camada de SPS (técnica da *dupla camada* ou *sobrecamada*). Incubou-se as placas em atmosfera de anaerobiose à 46°C/24 h, segundo a portaria 451 (BRASIL, 1998, p.5). A

atmosfera de anaerobiose foi feita no interior da *Jarra de Anaerobiose*, utilizando-se de: 5 g de palha de aço; 75 mL de solução Acidulada de Sulfato de Cobre 5%; dois comprimidos de *Sonrisal*[®] (8,0 g); papel indicador; *Becher* de 250 mL; 75 mL de H_2O destilada e placas de *Petri* vazias (JÜRGENSEN, 1981, p. 75).

Mesmo sendo recomendado por LABBE & HARMON (*ibid.*), o uso de Ágar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC), com ou sem adição de gema de ovo, usou-se no lugar dele, o SPS, pois além da sua praticidade ser citada por outras literaturas internacionais, SILVA *et al.* (1997, p. 65 e 70), descrevem que o SPS não permite o crescimento e produção de toxina de *Clostridium botulinum*, garantindo a segurança do analista e do laboratório.

Para a contagem de placas padroniza-se a escolha de placas que contenham de 20 a 200 UFC negras, pois os clostrídios reduzem sulfito a sulfeto, que reage com o ferro e precipita-se na forma de sulfeto de ferro, dando uma coloração negra às UFC de *C. perfringens*. Porém não houve crescimento nas placas de SPS. Pelo fato de não ter ocorrido a presença de *Clostridium perfringens* nas amostras analisadas, a contagem, o cálculo dos resultados e os testes confirmativos que se encontram discriminados a seguir, não foram procedidas.

Caso ocorresse crescimento de *C. perfringens*, seriam selecionadas cinco UFC típicas e transferidas para meio de Tioglicolato.

Incubadas à 35°C-37°C/24 h e inocularia-se a cultura obtida nos meios usados para os testes confirmativos.

O resultado seria expresso através do cálculo do número de UFC/g em função do número de UFC típicas, diluição inoculada e percentagem de UFC confirmadas. Exemplo: plaqueamento em profundidade, diluição 10^{-2} , 25 UFC típicas, 10 submetidas à confirmação, oito confirmadas (80%). O cálculo seria feito da seguinte forma, $25 \times 10^2 \times 0,8 = 2,0 \times 10^3$ UFC/g (SILVA *et al.*, 1997, p. 71).

3.2.3.1 Testes confirmativos

3.2.3.1.1 *Teste de fermentação da lactose e hidrólise da gelatina*

Seria inoculado uma alçada da cultura obtida a partir do meio de Tioglicolato, em tubos contendo meio de Lactose Gelatina e incubados à 35°C-37°C/24-48 h. Observaria-se a formação de bolhas e viragem ácida do indicador (vermelho de fenol), alterando a cor do meio de vermelha para amarela (fermentação da lactose positiva), ou se o meio permaneceria com a cor inalterada (fermentação da lactose negativa). Os tubos seriam transferidos para uma geladeira e ficariam mantidos sob refrigeração por duas horas,

observando-se em seguida se o meio permanecia líquido (hidrólise da gelatina positiva) ou se adquiria uma consistência firme (hidrólise da gelatina negativa). As cepas de *C. perfringens* hidrolizam a gelatina e fermentam a lactose.

3.2.3.1.2 *Teste de coagulação tempestuosa do leite*

A partir do meio de Tioglicolato, seriam inoculados tubos contendo meio de Leite Ferro e incubados à 45°C/18-24 h. Observar-se-ia a ocorrência de coagulação tempestuosa do leite, com rompimento e deslocamento do coágulo (teste positivo) ou a ocorrência de coagulação normal ou não coagulação do leite (teste negativo). As cepas de *C. perfringens* provocam a fermentação tempestuosa do leite (SILVA et al., 1997, p. 70-71).

3.2.3.1.3 *Teste de redução do nitrato e de motilidade*

Com o auxílio de uma agulha de inoculação, faria-se a semeadura da cultura, por picada, no centro do Ágar Nitrato Motilidade, até a profundidade distante 1 cm do fundo do tubo. Incubando-se à 35°C-37°C/24 h e faz-se-ia a leitura do teste de motilidade, observando se havia migração de células para regiões fora da linha de inoculação (motilidade positiva), ou se o crescimento

restringia-se à região da picada (motilidade negativa). As cepas de *C. perfringens* são imóveis.

Para a realização do teste de redução do nitrato, adicionar-se-ia aos tubos de cultura 0,1 mL de cada um dos reagentes para teste de nitrato (solução de 0,8% de ácido sulfanílico e solução de 0,5% de alfa-naftilamina). Imediatamente iria ser observado o desenvolvimento de cor vermelha ou laranja no meio (teste positivo) e, em caso negativo, dever-se-ia adicionar uma pitada de pó de zinco ao meio, observando a alteração de cor. Caso o meio continuasse com a cor inalterada, não haveria nitrato presente, indicando teste positivo. Porém, se o meio adquirisse a cor vermelha, o zinco reduziria o nitrato a nitrito artificialmente, indicando teste negativo. As cepas de *C. perfringens* reduzem o nitrato.

3.2.3.1.4 *Teste de fermentação da rafinose e salicina*

A partir de uma cultura de 24 horas em meio de Tioglicolato, seriam inoculados em tubos de meio de Fermentação para *C. perfringens*. Incubaria-se à 35°C-37°C/24 h e verificaria-se se ocorria produção de ácido, transferindo-se 1,0 mL da cultura para um tubo de ensaio e adicionando-se duas gotas de solução 0,04% de azul de bromotimol. O desenvolvimento de uma cor amarela no meio de cultura indica teste positivo. Em caso negativo,

deve-se reincubar a cultura e verificar novamente com 48 h e com 72 h de incubação. As cepas de *C. perfringens* fermentam a rafinose e não fermentam a salicina.

3.2.4 Análise da água de abastecimento

Para a determinação do NMP de coliformes totais, seguiu-se a metodologia descrita para *E. coli* de HITCHINS et al. (1992, p. 325-369), a partir dos tubos positivos de LST transferiu-se alíquotas de 1 mL para cada três tubos correspondentes contendo Caldo Verde Brilhante Bile (VBBL), incubou-se à 35°C-37°C/24-48 h. Dos tubos positivos foi consultada a tabela para NMP de acordo com PEELER et al. (1992, p. 112-116).

Em seguida foi utilizada a metodologia para coliformes fecais e identificação de *E. coli*, já descrita na seção 3.2.1 (p. 94-95).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste estudo utilizou-se o coeficiente de correlação e a covariância para verificar o grau de dependência entre os valores encontrados nas amostras analisadas, principalmente entre as amostras de carne crua e carne cozida.

Segundo BERQUÓ et al. (1981, p. 98), em pesquisas que envolvem a consideração de duas ou mais variáveis, estas são estudadas simultaneamente, procurando-se uma possível correlação entre elas, isto é, quer-se saber se as alterações sofridas por uma das variáveis são acompanhadas por alterações nas outras. No caso particular de duas variáveis X e Y, procura-se verificar se os aumentos (ou diminuições) em X, correspondem a aumentos (ou diminuições) em Y, ou se aumentos (ou diminuições) em X são acompanhados de diminuições (ou aumentos) em Y ou, finalmente, se os aumentos (ou diminuições) em X não estão relacionados com as alterações em Y.

No caso de X e Y apresentarem variações em um mesmo sentido, diz-se que entre elas existe correlação positiva; quando as variações de X e Y são em sentidos contrários, trata-se de correlação negativa; finalmente, quando a variação de X não está relacionada com a variação de Y, é o caso de não haver correlação (VIEIRA, 1981, p. 79; BERQUÓ et al., 1981, p. 98-99).

De especial importância para o estudo da correlação entre duas variáveis é a covariância, que mede a variação concomitantemente dessas variáveis. No caso de uma correlação positiva, a covariância apresentará um sinal positivo; na correlação negativa, a covariância também será negativa; e no caso de não existir uma correlação, a covariância é nula (BERQUÓ et al., 1981, p. 101-103).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As técnicas microbiológicas utilizadas na pesquisa permitiram avaliar diferentes características associadas à microbiota bacteriana presente na carne crua, carne cozida, mãos de manipuladores e utensílios.

Os resultados da determinação do número mais provável de coliformes totais e fecais para todas as 22 amostras de água analisadas (100%) sempre apresentaram valores de $< 0,3 \times 10^1$ NMP/mL (Tab. 11).

Este resultado deve-se principalmente pelo fato da água ser fornecida pela Companhia Estadual de Água e Esgoto do Rio de Janeiro (CEDAE-RJ), além do uso de pastilhas de Cloro nas cisternas e caixas d'água das instituições de ensino.

O Gráfico 1 demonstra a relação das amostras com as estimativas do Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes fecais e a percentagem de UFC identificadas como *Escherichia coli* através das provas bioquímicas, em conformidade com a Tabela 12.

Das 67 (100%) UFC isoladas para as provas bioquímicas de identificação de *Escherichia coli*, 38 (56,72%) sugeriram positividade para esta espécie (Gráfico 2).

Das 22 (100%) amostras de carne crua, oito (36,36%) apresentaram um número mais provável de coliformes fecais (Tab. 10), sendo que destas oito amostras, duas (25%) apresentaram uma contagem de NMP acima de $10^3/g$, estando fora dos padrões de acordo com a consulta pública nº 5 de 21 de outubro de 1999 (BRASIL, 1999, p. 45), ainda não se encontrando em vigor.

Ainda de acordo com a consulta pública nº 5 (*ibid.*, p. 52), das 22 (100%) amostras de carne crua analisadas, 20 (90,9%) atenderam aos limites estabelecidos, sendo classificadas como produtos em condições higiênicas satisfatórias, enquanto que apenas duas (9,1%) apresentaram coliformes fecais, classificando-se como produtos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias (Gráfico 4), entretanto, a legislação em vigor, portaria 451 (BRASIL, 1998, p. 4-13), não estabelece padrões de identidade e finalidade para o alimento mencionado.

LEITE *et al.* (1988, p. 161), publicaram que 56% das amostras de produtos cárneos crus apresentavam um número mais provável de coliformes fecais fora dos padrões brasileiros. Porém, é importante ressaltar, que as amostras de carne crua que apresentaram número mais provável de coliformes fecais, após o cozimento (cocção) adequado não mais apresentavam NMP de coliformes fecais. De fato, CREMER & CHIPLEY (1980, p. 1476), avaliaram fases de cocção de carne (antes e após a cocção), confirmando que a cocção

adequada é de extrema importância para a extinção dos coliformes fecais do alimento.

Não houve correlação entre a carne crua e a carne cozida, pois o coeficiente de correlação foi nulo ($r=0$). A covariância também foi nula, demonstrando, assim, que ocorreu uma independência entre as variáveis carne crua e carne cozida (Gráfico 5), comprovando a importância da cocção na diminuição da carga bacteriana.

Na presente pesquisa, duas (9,1%) amostras de *swab* de mãos apresentaram número mais provável de coliformes fecais (Tab. 10). Não houve detecção de coliformes fecais, *S. aureus* e *C. perfringens* em *swab* de utensílios. Entretanto, SILVA JR. & MARTINS (1991, p. 22), analisaram microbiologicamente 66 panelas, sendo que 12 (18%) foram isoladas *E. coli* e em três (4,5%), *S. aureus*. Além disso, BRYAN & MCKINLEY (1979, p. 4 e 6), isolaram *C. perfringens* de carne crua (60%), equipamentos (8%) e carne cozida (5%) e *S. aureus* de carne crua (47%), equipamentos (9%), manipuladores (100%) e carne cozida (16%).

Com base na característica morfotintorial (Cocos Gram +) e características fenotípicas (catalase positiva, oxidação e fermentação da glicose e manitol), sugere-se que das 115 (100%) UFC isoladas, 44 (38,26%) pertenciam ao gênero *Staphylococcus* (Gráfico 3).

Mesmo com a realização das provas DNase, termonuclease, VP e coagulase, não foi possível caracterizar a espécie *Staphylococcus aureus*, através das combinações das provas realizadas.

Do total de 88 amostras, distribuídas em 22 amostras de igual número de carne crua; carne cozida; *swab* de mão e *swab* de utensílio, 100% apresentaram ausência de *Staphylococcus aureus*.

Não foi detectada a presença de *Clostridium perfringens* em nenhuma das amostras analisadas (carne crua, carne cozida, *swab* de mãos e *swab* de utensílios).

Através destes resultados, ficou claro a importância de se conhecer os principais fatores que contribuem para que ocorra a contaminação nos alimentos e conseqüentemente o risco de ocorrer Doenças Transmitidas por Alimentos (D.T.A.); como cozimento inadequado, más condições das cozinhas, incorreta manipulação e principalmente uma pobre higiene pessoal. Tal como descreve MARTH (1985, p. 292-293), os principais fatores que contribuem para o aparecimento de surtos de toxinfecção alimentar são cozimento inadequado, uso de alimento de fonte insegura e higiene pessoal deficiente. O que também foi corroborado por REIS JR. & BRANDÃO (1996, p. 5), onde mostraram que 75% dos casos de toxinfecções se deve às más condições de cozinhas industriais, restaurantes, hospitais, etc, e cerca de 20% à incorreta manipulação em cozinhas domésticas, os outros 5% deve-se às condições inadequadas de produção na própria indústria. Além disso, SILVA &

SERAFINI (1997, p. 26), afirmam que os alimentos só se tornam perigosos após terem sido violados os princípios de higiene, ou então a permanência destes em condições que possam permitir a contaminação e/ou a multiplicação de microrganismos patogênicos.

Embora a portaria 451 de 19 de setembro de 1997, não estabeleça padrão de identidade e qualidade para a presença de Coliformes Fecais e *Escherichia coli* nos alimentos analisados nesta pesquisa, os valores encontrados para o microrganismo em questão sugeriram que estes não foram determinadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (D.T.A.) pois os seus ingestores não apresentaram nenhuma queixa nosológica, podendo até serem considerados como participantes da prova biológica.

Espera-se que os resultados obtidos neste trabalho possam servir de auxílio para o aprimoramento destes padrões microbiológicos, uma vez que, a consulta pública nº 5 de 21 de outubro de 1999, estabelece para Coliformes Fecais o número máximo de $10^3/g$ para cada amostra de carne crua (BRASIL, 1999, p. 45).

Não devemos nos esquecer que a negligência e/ou o desinteresse, ou mesmo a simples desinformação são os principais responsáveis pela ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (D.T.A.), conseqüentemente se faz necessário fornecer subsídios para que todos os profissionais da área de produção e manipulação de alimentos em cozinhas industriais (escolas, creches, hospitais, quartéis, asilos, etc.), sejam informados sobre os principais fatores de

risco de contaminação dos alimentos e, principalmente, reconheçam a importância da higiene na preparação destes alimentos, evitando-se assim as principais D.T.A.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através das análises realizadas nas amostras provenientes das instituições de ensino, mostraram que as condições higiênico-sanitárias na preparação de carne bovina servida em refeições escolares (merenda escolar) são satisfatórias, pois apenas duas (9,1%) amostras de carne crua encontraram-se acima dos padrões, porém a cocção adequada extinguiu esta contaminação.

As condições higiênico-sanitárias dos funcionários que manipulam alimentos e dos utensílios da cozinha são satisfatórias, não demonstrando comprometimento microbiológico quanto à manipulação e preparo dos alimentos.

As condições higiênico-sanitárias da água de abastecimento nas instituições de ensino municipais e estaduais, encontram-se dentro das normas e padrões de potabilidade da água destinada ao consumo humano de acordo com a portaria nº 36 de 19 de janeiro de 1990 (BRASIL, 1990, p. 1651).

Nem sempre as UFC características de *Escherichia coli*, com ou sem brilho verde metálico no meio EMB, apresentaram-se como positivas para este microrganismo, nas provas bioquímicas realizadas.

Em nenhuma das amostras analisadas foi detectada a presença de *Clostridium perfringens*.

O meio de plaqueamento seletivo/indicador para *Staphylococcus aureus* (meio ABP), apesar de indicar a presença de UFC típicas, estas não apresentaram características bioquímicas para este microrganismo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C. & SANTOS, G. C. Contaminação microbiológica de pratos cárneos servidos a pacientes em hospitais da cidade de Salvador. **Higiene Alimentar**. Vol. 9, n. 36. Março/Abril. 1995, p. 27-30.
- ANDERSSON, A.; RÖNNER, U. & GRANUM, P. E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**. n. 28. 1995, p. 145-155.
- ANDRADE, G. P. **Verificação em portadores assintomáticos da ocorrência simultânea nas mãos, boca e fezes de cepas de *Staphylococcus aureus* enteropatogênica**. São Paulo, 1988. 63 p. Tese de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo.
- ARRUDA, G. A. **Manual de Boas Práticas - Vol. I - Hotéis e Restaurantes**. 2ª edição. São Paulo : Ponto Crítico. 1997, 191 p.
- BEAN, N. H.; GOULDING, J. S.; DANIELS, M. T. & ANGULO, F. J. Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1988-1992. **Journal of Food Protection**. Vol. 60, n. 10. October. 1997, p. 1265-1286.
- BELTRÁN, J. F. N.; NETO, A. C.; PIRES, E. M. F. & STAMFORD, T. L. M. Avaliação microbiológica de refeições servidas por empresas aéreas nacionais. **Higiene Alimentar**. Vol. 13, n. 59. Janeiro/Fevereiro. 1999, p. 49-56.
- BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P. & GOTLIEB, S. L. D. **Bioestatística**. 2ª edição. São Paulo : Editora Pedagógica e Universitária. 1981, 350 p.
- BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 23ª edição. São Paulo : Editora Melhoramentos. 1984, 1234 p.
- BOARD, R. G. **Introducción a la Microbiología Moderna de los Alimentos**. Zaragoza : Editorial Acribia. 1988, 271 p.
- BOURGEOIS, C. M.; MESCLE, J. F. & ZUCCA, J. **Microbiología Alimentaria. Volumen I. Aspectos Microbiológicos de la Seguridad y Calidad Alimentaria**. Zaragoza : Editorial Acribia. 1994, 437 p.

- BOYCE, T. G.; SWERDLOW, D. L. & GRIFFIN, P. M. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome. **The New England Journal of Medicine**. Vol. 333, n. 6. August. 1995, p. 364-368.
- BRANDLY, P. J.; MIGAKI, G. & TAYLOR, K. E. **Higiene de la Carne**. México : Compañia Editorial Continental. 1971, 773 p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. MS/SVS. Consulta Pública nº 5 de 21 de outubro de 1999. Propõe o Regulamento Técnico para Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial**. Brasília. 28 de outubro de 1999, p. 42-53.
- _____. Gabinete do Ministro. Ministério da Saúde. GM/MS. Portaria nº 36 de 19 de janeiro de 1990. Aprova Normas e Padrão de Potabilidade da Água Destinada ao Consumo Humano. **Diário Oficial**. Brasília. 23 de janeiro de 1990, p. 1651-1654.
- _____. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. MS/SVS. Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos. Republicada por ter saído com incorreção, no D.O. nº 182, de 22/09/97, Seção 1, p. 21.005-21.012. **Diário Oficial**. Brasília. 02 de julho de 1998, p. 4-13.
- BRYAN, F. L. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. **Journal of Food Protection**. Vol. 43, n. 02. February. 1980, p. 140-150.
- _____. Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. **Journal of Food Protection**. Vol. 51, n. 08. August. 1988, p. 663-673.
- _____. Aplicação do método de análise de risco por pontos críticos de controle, em cozinhas industriais. Tradução: Eneo Alves da Silva Jr. **Higiene Alimentar**. Vol. 07, n. 25. Março. 1993, p. 15-22.
- BRYAN, F. L. & MCKINLEY, T. W. Hazard analysis and control of roasts beef preparation in foodservice establishments. **Journal of Food Protection**. Vol. 42, n. 1. January. 1979, p. 4-18.
- CARDOSO, R. C. V.; CHAVES, J. B. P.; ANDRADE, N. J. & TEIXEIRA, M. A. Avaliação da eficiência de agentes sanificantes para mãos de manipuladores de alimentos, em serviços de refeição coletiva. **Higiene Alimentar**. Vol. 10, n. 41. Janeiro/Fevereiro. 1996a, p. 17-22.

- _____. Avaliação da eficiência de agentes sanificantes sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* aplicados em mãos de voluntários. **Higiene Alimentar**. Vol. 10, n. 43. Maio/Junho. 1996b, p. 25-29.
- CARVALHO, C. O. & SERAFINI, A. B. Grupos de microrganismos isolados da orofaringe, nasofaringe e das mãos dos trabalhadores do restaurante da Universidade federal de Goiás. **Higiene Alimentar**. Vol. 10, n. 45. Setembro/Outubro. 1996, p. 19-24.
- COELHO, A. I. M. & VANETTI, M. C. D. Avaliação microbiológica de carnes preparadas em restaurante institucional. **Higiene Alimentar**. Vol. 08, n. 32. Julho. 1994, p. 27-33.
- CREMER, M. L. & CHIPLEY, J. R. Time and temperature, microbiological, and sensory assessment of roast beef in hospital foodservice system. **Journal of Food Science**. Vol. 45. 1980, p. 1472-1477.
- FERNÁNDEZ, A. F. & BERENQUER, L. F. Estudio microbiológico de platos preparados congelados de venta a granel. **Alimentaria**. Enero/Febrero. 1992, p. 61-68.
- FIGUEIREDO, L. R. Biocontaminação ambiental e humana por baratas domésticas. **Vetores & Praças**. Ano I, n. 03. 1998, p. 04-06.
- FLORENTINO, E. R.; LEITE Jr., A. F.; SÁ, S. N.; ARAÚJO, M. S. O. & MARTINS, R. S. Avaliação da qualidade microbiológica da carne moída comercializada em Campina Grande - PB. **Higiene Alimentar**. Vol. 11, n. 47. Janeiro/Fevereiro. 1997, p. 38-41.
- FRANCO, B. D. G. M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte : Editora Atheneu. 1996, 182 p.
- FRAZIER, W. C. & WESTHOFF, D. C. **Microbiología de los Alimentos**. 4ª edición. Zaragoza : Editorial Acribia. 1993, 681 p.
- FRUIN, J. T. Types of *Clostridium perfringens* isolated from selected foods. **Journal of Food Protection**. Vol. 41, n. 10. October. 1978, p. 768-769.
- GAVA, A. J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. 2ª edição. São Paulo : Editora Nobel. 1979, 284 p.
- GENIGEORGIS, C. Public health importance of *Clostridium perfringens*. **Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA)**. Vol. 167, n. 9. November. 1975, p. 821-827.

- GERMANO, P. M. L.; MIGUEL, M.; MIGUEL, O. & GERMANO, M. I. S. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. **Higiene Alimentar**. Vol. 7, n. 27. Agosto. 1993, p. 6-10.
- GONÇALVES, P. M. R. Toxinfecções alimentares: uma revisão. **Higiene Alimentar**. Vol. 12, n. 53. Janeiro/Fevereiro. 1998, p. 38-44.
- GRISWOLD, R. M. **Estudo Experimental dos Alimentos**. São Paulo : Editora Edgard Blücher Ltda. 1972, 469 p.
- HARES, L. F.; LISERRE, A. M. & SOUZA, M. L. **Manual Técnico – Noções Básicas de Microbiologia e Parasitologia para Manipuladores de Alimentos – Olho Vivo na Qualidade – Módulo I**. São Paulo : Friuli Consultoria e Serviços Técnicos S/C Ltda. 1998, 53 p.
- HAYES, P. R. **Microbiologia e Higiene de los Alimentos**. Zaragoza : Editorial Acribia. 1993, 369 p.
- HAZELWOOD, D. & McLEAN, A. C. **Manual de Higiene para Manipuladores de Alimentos**. São Paulo : Livraria Varela. 1994, 140 p.
- HINGLEY, A. **Focus on Food Safety. Initiative Calls on Government, Industry, Consumers to Stop Food-Related Illness**. [online]. September-October 1997. Disponível: <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/fdsafety.html> [capturado em 11 jan. 1999].
- HITCHINS, A. D.; HARTMAN, P. A. & TODD, E. C. D. Coliforms – *Escherichia coli* and its toxins. Cap. 24, p. 325-369. In : VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods**. 3rd edition. Washington : American Public Health Association (APHA). 1992, 1912 p.
- HOBBS, B. C. *Clostridium perfringens* food poisoning. In : **Global Impacts of Applied Microbiology (Impactos Globais da Microbiologia Aplicada) - IV Conferência Internacional**. 23 a 28 de julho de 1973. São Paulo - Brasil. P. 751-763.
- HOBBS, B. C. & ROBERTS, D. **Food Poisoning and Food Hygiene**. 6th edition. San Diego : Singular Publishing Group, Inc. 1993, 391 p.
- _____. **Toxinfecções e Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos**. 1^a edição. São Paulo : Livraria Varela. 1998, 376 p.
- HOFFMANN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C. H. & VINTURIM, G. C. Determinação da atividade antibacteriana de desinfetantes. **Higiene Alimentar**. Vol. 9, n. 39. Setembro/Outubro. 1995, p. 29-34.

- HOFFMANN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C. H. & VINTURIM, T. M. Qualidade de amostras de carnes e de presunto. **Higiene Alimentar**. Vol. 12, n. 58. Novembro/Dezembro. 1998, p. 52-57.
- HOFFMANN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VINTURIM, T. M. & FAZIO, M. L. S. Qualidade microbiológica da água consumida na cidade de São José do Rio Preto - SP. **Higiene Alimentar**. Vol. 11, n. 52. Novembro/Dezembro. 1997, p. 47-49.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T. & WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9th edition. Baltimore : Williams & Wilkins. 1994, 787 p.
- JAY, J. M. **Microbiología Moderna de los Alimentos**. 3^a edición. Zaragoza : Editorial Acriba. 1994, 804 p.
- JÜRGENSEN, C. A. Caracterização preliminar ao nível de Gênero para bactérias anaeróbias predominantes em material clínico. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**. Vol. 17, n. 3. 1981, p. 74-77.
- LABBE, R. G. Relationship between sporulation and enterotoxin production in *Clostridium perfringens* type A. **Food Technology**. Vol. 34, n. 04. April. 1980, p. 88-90.
- _____. Symposium on microbiology update: old friends and new enemies. *Clostridium perfringens*. **Journal of Official Analytical Chemists**. Vol. 74, n. 4. 1991, p. 711-714.
- LABBE, R. G. & HARMON, S. M. *Clostridium perfringens*. Cap. 37, p. 623-635. In : VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods**. 3rd edition. Washington : American Public Health Association (APHA). 1992, 1912 p.
- LANCETTE, G. A. & TATINI, S. R. *Staphylococcus aureus*. Cap. 33, p. 533-550. In : VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods**. 3rd edition. Washington : American Public Health Association (APHA). 1992, 1912 p.
- LANDGRAF, M. Novos patógenos de interesse em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Vol. 31, n. 1. Janeiro/Junho. Campinas, SP. 1997, p. 05-07.
- LEDERER, J. **Enciclopédia Moderna de Higiene Alimentar - Tecnologia e Higiene Alimentar - Tomo III**. São Paulo : Editora Manole Dois. 1991a, 121 p.

- _____. **Enciclopédia Moderna de Higiene Alimentar - Tecnologia e Higiene Alimentar - Tomo IV.** São Paulo : Editora Manole Dois. 1991b, 263 p.
- LEITE, C. Q. F.; VALENTINI, S. R. & FALCÃO, D. Pesquisa de enteropatógenos em alimentos cárneos crus. **Ciência Tecnologia de Alimentos.** Vol. 08, n. 02. Julho. 1988, p. 155–168.
- LIBBY, J. A. **Meat Hygiene.** 4th edition. Philadelphia : Lea & Febiger. 1975, 658 p.
- LINDNER, E. **Toxicología de los Alimentos.** 2^a edición. Zaragoza : Editorial Acribia. 1995, 262 p.
- MARTH, E. H. Public health and regulatory concerns of the foodservice industry. **Dairy Food Sanitation.** Vol. 05, n. 08. August. 1985, p. 292–297.
- MATHIEU, A. M.; IZIGIDI, B. K.; DEVRIESE, L. A. *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella spp.* Strains isolated from bovine meat in Zaire. **International Journal of Food Microbiology.** Vol. 14, n. 02. March/April. 1991, p. 119–125.
- MENG, J.; DOYLE, M. P.; ZHAO, T. & ZHAO, S. Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in Food Science & Technology.** Vol. 5. June. 1994, p. 179-185.
- MESSER, J. W.; MIDURA, T. F. & PEELER, J. T. Sampling plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis. Cap. 2, p. 25–49. In : VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods.** 3rd edition. Washington : American Public Health Association (APHA). 1992, 1912 p.
- MORRIS Jr., J. G. Current trends in human diseases associated with foods of animal origin. **Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA).** Vol. 209, n. 12. December. 1996, p. 2045-2047.
- MORTAJEMI, Y.; KÄFERSTEIN, F.; MOY, G. & QUEVEDO, F. Uma ameaça para as crianças: os alimentos contaminados. Tradução: Fernando Melgaço de Assumpção Costa. **Higiene Alimentar.** Vol. 10, n. 46. Novembro/Dezembro. 1996, p. 13–15.
- MOSEL, D. A. A. & GARCIA, B. M. **Microbiología de los Alimentos - Fundamentos Ecológicos para Garantizar la Inocuidad y la Calidad de los Alimentos.** 1^a edición. Zaragoza : Editorial Acribia. 1985, 375 p.

- NARAYAN, K. G. Food borne infection with *Clostridium perfringens* type A. **International Journal of Zoonoses**. n. 9. 1982, p. 12-32.
- NOTERMANS, S. H. W. & BORGdorFF, M. W. A global perspective of foodborne disease. **Journal of Food Protection**. Vol. 60, n. 11. November. 1997, p. 1395-1399.
- PANETTA, J. C. O manipulador: fator de segurança e qualidade dos alimentos. **Higiene Alimentar**. Vol. 12, n. 57. 1998, p. 8-11.
- PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R. & PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne - Vol. I - Ciência e Higiene da Carne. Tecnologia da sua Obtenção e Transformação**. 1ª edição. Goiânia : EDUFF. Editora UFG. 1995, 586 p.
- PEARSON, A. M. & DUTSON, T. R. **Advances in Meat Research - Vol. 2 - Meat and Poultry Microbiology**. Connecticut : Avi Publishing Company. 1986, 436 p.
- PEELER, J. T.; HOUGHTBY, G. A. & RAINOSEK, A. P. The most probable number technique. Cap. 6, p. 105–120. In : VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods**. 3rd edition. Washington : American Public Health Association (APHA). 1992, 1912 p.
- PELCZAR, M.; REID, R. & CHAN, E. C. S. **Microbiologia - Vol. I e II**. São Paulo : Editora McGraw-Hill. 1981, 1072 p.
- PEREIRA, M. L.; PEREIRA, J. L.; SERRANO, A. M. & BERGDOLL, M. S. Estafilococos e alimentos: possibilidades de disseminação do portador humano e animal. **Higiene Alimentar**. Vol. 13, n. 66/67. Novembro/Dezembro. 1999, p. 48-55.
- REED, G. H. Foodborne illness (Part 1). Staphylococcal ("*Staph*") food poisoning. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**. Vol. 13, n. 11. November. 1993, p. 642.
- _____. Foodborne illness (Part 3). *Clostridium perfringens* gastroenteritis. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**. Vol. 14, n. 1. January. 1994, p. 16-17.
- REGAN, C. M.; SYED, Q. & TUNSTALL, P. J. A hospital outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning - implications for food hygiene review in hospitals. **Journal of Hospital Infection**. Vol. 29, n. 1. 1995, p. 69-73.

- REIS Jr., J. S. & BRANDÃO, S. C. C. Fiscalização de alimentos de origem animal: custos e benefícios. **Higiene Alimentar**. Vol. 10, n. 41. Janeiro/Fevereiro. 1996, p. 05–06.
- RIEDEL, G. **Controle Sanitário dos Alimentos**. 2ª edição. São Paulo, Rio de Janeiro : Editora Atheneu. 1992, 320 p.
- ROBERTS, H. R. **Sanidad Alimentaria**. Zaragoza : Editorial Acribia. 1981, 261 p.
- ROÇA, R. O. **Orientação Institucional: Avaliação e Orientação do Comércio Varejista de Alimentos. Assistência e Orientação nas Atividades de Fiscalização Municipal**. [online]. Disponível: <http://fca.unesp.br/dca/tpoa/site7.htm> [capturado em 27 abr. 1999].
- ROHRS, B. *Clostridium perfringens*. Not the 24 hour flu. **The Ohio State University Extension Factsheet**. [online]. 1998. Disponível: <http://www.ag.ohio-state.edu/~ohioline/hyg-fact/5000/5568.html> [capturado em 25 de jan. 1999].
- ROITMAM, I.; TRAVASSOS, L. R. & AZAVEDO, J. L. **Tratado de Microbiologia – Volume 1**. são Paulo : Editora Manole. 1988, 186 p.
- ROSSI Jr., O. D.; SCOCCEN-ITURRINO, R. P. & NADER FILHO, A. A análise bacteriológica de carnes de hambúrguer de fabricação industrial e caseira, comercializados em Jaboticabal-SP. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Vol. 37, n. 03. Junho. 1985, p. 265-279.
- RUDGE, A. C. Determinação de toxinas produzidas pelo *Clostridium perfringens* em produtos cárneos colocados à venda para o consumo humano. **Higiene Alimentar**. Vol. 01, n. 02. Agosto. 1982, p. 110–113.
- SCHILLING, M. **Qualidade em Nutrição - Métodos de Melhorias Contínuas ao Alcance de Indivíduos e Coletividades**. 2ª edição. São Paulo : Livraria Varela. 1998, 151 p.
- SILVA, C. A. & SERAFINI, A. B. Análise microbiológica das refeições servidas no restaurante da Universidade Federal de Goiás, entre junho e novembro de 1994. **Higiene Alimentar**. Vol. 11, n. 48. Março/Abril. 1997, p. 26–29.
- SILVA, J. A. A microbiologia da carcaça bovina: uma revisão. **Revista Nacional da Carne**. Ano XXI, n. 248. Outubro. 1997, p. 62-86.
- SILVA Jr., E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. 2ª edição. São Paulo : Livraria Varela. 1996, 385 p.

- SILVA Jr., E. A. & MARTINS, E. A. Análise microbiológica em cozinhas industriais. **Higiene Alimentar**. Vol. 05, n. 17. Março. 1991, p. 20–24.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. & SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo : Livraria Varela. 1997, 295 p.
- SIMONE, E.; GOOSEN, M.; NOTERMANS, S. H. W. & BORGDORFF, M. W. Investigation of foodborne diseases by food inspection services in the Netherlands, 1991 to 1994. **Journal of Food Protection**. Vol. 60, n. 04. April. 1997, p. 442-446.
- SIQUEIRA, R. S. **Manual de Microbiologia de Alimentos**. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agro-industrial de Alimentos (Rio de Janeiro-RJ). Brasília : EMBRAPA-SPI; Rio de Janeiro : EMBRAPA-CTAA. 1995, 159 p.
- SMITH. J. L. Foodborne illness in the elderly. **Journal of Food Protection**. Vol. 61, n. 9. September. 1998, p. 1229-1239.
- SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. & HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Vol. 2**. Baltimore : Williams & Wilkins. 1986, 1599 p.
- SOUSA, A. A. & BRADACZ, D. C. Análise de perigos e pontos críticos de controle (APCC) em uma cozinha hospitalar. **Higiene Alimentar**. Vol. 11, n. 47. Janeiro/Fevereiro. 1997, p. 27–33.
- STEHULAK, N. *Staphylococcus aureus*. A most common cause. **The Ohio State University Extension Factsheet**. [online]. 1998. Disponível: <http://www.ag.ohio-state.edu/~ohioline/hyg-fact/5000/5564.html> [capturado em 25 jan. 1999].
- TANCREDI, R. C. P. **Prevalência de surtos de toxinfecções alimentares envolvendo alimentos de origem animal, ocorridos no município do Rio de Janeiro durante o período de 1986 a 1988**. Niterói, 1990. 135 p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense.
- TAUXE, R. V. Foodborne illnesses. Strategies for surveillance and prevention. **The Lancet**. Vol. 352, suppl. IV. 1998, p. 10.
- TODD, E. C. D. Factors that contributed to foodborne diseases in Canada, 1973-1977. **Journal of Food Protection**. Vol. 46, n. 8. August. 1983, p. 737-747.

- _____. Foodborne disease in Canada - a 10-year summary from 1975 to 1984. **Journal of Food Protection**. Vol. 55, n. 02. February. 1992, p. 123-132.
- TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F. & TRABULSI, L. R. EPM - Modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H_2S , urease e triptofano desaminase. **Revista de Microbiologia**. Vol. 13, n. 4. Outubro/Dezembro. 1982a, p. 309-315.
- _____. MILi - Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Revista de Microbiologia**. Vol. 13, n. 3. Julho/Setembro. 1982b, p. 230-235.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, R. B. & CASE, C. L. **Introducción a la Microbiología**. Zaragoza : Editorial Acribia. 1993, 792 p.
- TÓRTORA, J. C. O. Epidemiologia das doenças microbianas transmitidas por alimentos. **Germinis - Boletim informativo do Conselho Federal de Biologia**. Ano 1, n. 5. Janeiro/Fevereiro. 1998, p. 08.
- TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 2ª edição. Rio de Janeiro, São Paulo : Livraria Atheneu Editora. 1991, 398 p.
- UNGAR, M. L.; GERMANO, M. I. S. & GERMANO, P. M. L. Riscos e conseqüências da manipulação de alimentos para a saúde pública. **Higiene Alimentar**. Vol. 06, n. 21. Março. 1992, p. 14-32.
- USFDA (United State Food & Drug Administration). Center for Food Safety & Applied Nutrition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. *Clostridium perfringens*. **The Bad Bug Book**. [online]. 1992a. Disponível: <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap11.html> [capturado em 07 de jan. 1999].
- _____. *Staphylococcus aureus*. **The Bad Bug Book**. [online]. 1992b. Disponível: <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap3.html> [capturado em 07 de jan. 1999].
- VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods**. 3rd edition. Washington : American Public Health Association (APHA). 1992, 1912 p.
- VERONESI, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8ª edição. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan. 1991, 1082 p.
- VIEIRA, S. **Introdução à Bioestatística**. Rio de Janeiro : Editora Campus. 1981, 294 p.

WORSFOLD, D. & GRIFFITH, C. Food safety behaviour in the home. **British Food Journal**. Vol. 99, n. 3. 1997, p. 97-104.

ANEXOS

TABELA 1 Incidência de surtos e casos de doenças transmitidas por alimentos, por *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, relatados pelo serviço de inspeção de alimentos na Holanda, no período de 1991 a 1994.

Microrganismos	1991		1992		1993		1994	
	Surtos	Casos	Surtos	Casos	Surtos	Casos	Surtos	Casos
<i>C. perfringens</i>	9 (1,7%)	24 (1,4%)	8 (1,3%)	61 (3,2%)	1 (0,2%)	6 (0,3%)	6 (0,7%)	26 (1,2%)
<i>E. coli</i>	4 (0,7%)	144 (8,5%)	5 (0,8%)	17 (0,9%)	1 (0,2%)	1 (0,1%)	1 (0,1%)	4 (0,2%)
<i>S. aureus</i>	5 (0,9%)	39 (2,3%)	4 (0,7%)	7 (0,4%)	3 (0,5%)	5 (0,3%)	2 (0,2%)	5 (0,2%)
TOTAL*	543	1697	615	1885	563	1769	900	2216

* Total de todos os surtos, causados por diferentes microrganismos, no mesmo período.
Fonte: SIMONE *et al.*, 1997, p. 443 (modificado).

TABELA 2 Percentagem de *C. perfringens* e *S. aureus* isolados de carne crua, carne cozida, mãos de manipuladores e equipamentos.

AMOSTRAS	<i>C. perfringens</i>			<i>S. aureus</i>		
	Total de amostras	Amostras positivas	%	Total de amostras	Amostras positivas	%
Carne crua	5	3	60%	15	7	47%
Carne cozida	19	1	5%	32	5	16%
Manipuladores	2	0	0%	2	2	100%
Equipamentos	26	2	8%	34	3	9%

Fonte: BRYAN & MCKINLEY, 1979, p. 6 (modificado).

TABELA 3 Resultados microbiológicos, em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g), encontrados em carne antes e após a cocção.

CARNE	Estafilococos	Coliformes	Clostrídios
Antes da cocção	$3,4 \times 10^2$	$1,9 \times 10^4$	$1,04 \times 10^4$
Após a cocção	10	0	$2,7 \times 10^2$

Fonte: CREMER & CHIPLEY, 1980, p. 1476.

TABELA 4 Percentagem dos principais fatores que contribuem para a contaminação alimentar, sobrevivência e crescimento microbiano que favorecem com as D.T.A.

F A T O R E S	%
Resfriamento impróprio	26,3%
Falha no processamento	23,7%
Estocagem por longo tempo	8,1%
Vazamento pós processamento	6,8%
Manipuladores infectados	5,5%
Ingredientes crus contaminados	3,3%
Estocagem quente inadequada	3,3%
Manipulação imprópria ou sanificação deficiente	3,2%
Limpeza inadequada dos equipamentos	2,6%
Espécies tóxicas confundidas com comestíveis	2,6%
Prática de estocagem precária	2,5%
Uso de sobras	2,4%
Alimento de fontes perigosas	2,1%
Recontaminação ou contaminação cruzada	1,5%
Alimento preparado com antecedência	1,4%
Descongelamento inadequado	1,4%
Reaquecimento inadequado	0,9%
Uso de água contaminada	0,3%
Outros	2,1%

Fonte: TODD, 1983, p. 738 (modificado).

TABELA 5 Incidência das principais formas de conduta nos estágios da preparação do alimento.

Estágio da Preparação	Conduta	%
Transporte	Transporte de alimento sujeito à temperatura elevada.	45%
Refrigeração	Ingredientes estocados acima de 5°C.	58%
Manipulação e Preparação de Alimentos Crus	Mãos não lavadas antes da preparação.	66%
	Mãos não lavadas depois da manipulação dos ingredientes com o alimento cru.	58%
	Carne removida da área de preparação sem embalagem.	18%
	Alguns/Todos os vegetais não foram lavados.	41%
	Ave cru lavada na pia.	33%
	Todos os ingredientes cortados sobre uma única tábua.	60%
	Limpeza inadequada da tábua de corte.	25%
Cocção	Produto não cozinhou internamente à temperatura de pelo menos 74°C.	15%
Manipulação Pós Cocção	Produto cozido permaneceu no ambiente por mais de 90 min.	35%
	Produto cozido cortado na tábua sem limpeza adequada.	8%
	Produto cozido manipulado diretamente.	9%
	Produto cozido estocado em refrigeração à temperatura maior que 5°C.	17%
	Produto não reaquecido interiormente a pelo menos 74°C.	11%
	Produto reaquecido mais de uma vez, com intervalos de permanência na temperatura ambiente.	6%

Fonte: WORSFOLD & GRIFFITH, 1997, p. 99.

TABELA 6 Causas ou fatores que com maior frequência determinaram a presença de casos e surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (D.T.A.).

CAUSAS ou FATORES	%*
Esfriamento inadequado dos alimentos cozidos	48%
Alimentos preparados um dia antes do consumo	34%
Cocção ou tratamento térmico inadequado	32%
Contato de pessoas infectadas (manipuladores) com alimentos já preparados	27%
Reaquecimento culinário não adequado dos alimentos cozidos e refrigerados	20%
Armazenamento ou conservação defeituosos à temperatura elevada dos alimentos cozidos	19%
Contaminação cruzada dos alimentos cozidos a partir de produtos frescos	15%

* As porcentagens somam mais de 100, já que um mesmo surto pode ocorrer devido a duas ou mais causas.

Fonte: MOSSEL & GARCIA, 1985, p. 8.

TABELA 7 Pontos Críticos e Pontos Críticos de Controle (PCC) identificados em pratos protéicos.

OPERAÇÃO	PERIGO	MEDIDAS DE CONTROLE	MONITORAMENTO
Descongelamento	Crescimento bacteriano; contaminação do local pela água de descongelamento; descongelamento incompleto.	Descongelar no tempo e na temperatura adequadas para impedir crescimento bacteriano.	Verificar o método de descongelamento; observar se o alimento está completamente descongelado.
Pré-preparo e cortes	Microorganismos patogênicos; contaminação das superfícies e mãos do manipulador; multiplicação bacteriana se a temperatura permanecer acima das recomendações.	Higienizar e sanificar as mãos, utensílios e todas as superfícies de trabalho antes do pré-preparo.	Verificar a higienização e sanificação. Verificar se a temperatura das carnes não permanece por mais de 1 hora abaixo de 7°C.
Cocção (PCC)	Sobrevivência de esporos.	Destruir microrganismos patogênicos.	Verificar se a temperatura de cocção alcança 74°C/5 min.
Preparo após cocção (PCC)	Contaminação por manipuladores de alimentos, equipamentos e utensílios.	Evitar tocar nas carnes. Higienizar e sanificar utensílios antes de manipular as preparações.	Observar as práticas recomendadas.
Distribuição (PCC)	Germinação de esporos e multiplicação de células bacterianas.	Manter a temperatura das carnes acima de 60°C.	Medir a temperatura no centro geométrico das carnes ou nas porções superiores das cubas; medir a temperatura dos sistemas de manutenção do calor (balcão térmico).

Fonte: SOUSA & BRADACZ, 1997, p. 28.

TABELA 8 Critérios e limites de Coliformes Fecais, Clostrídios Sulfitos Redutores e *Staphylococcus aureus*, para produtos cárneos.

CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS	Coliformes Fecais: NMP (máximo)	Clostrídios Sulfitos Redutores: a 46°C (máximo)	<i>Staphylococcus aureus</i> : NMP ou contagem direta (máximo)
a) Carnes frescas <i>in natura</i> .	---	---	---
b) Carne resfriada ou congelada <i>in natura</i> (1/2 carcaça, quartos ou cortes). Bovinos, suínos e outros. Aves. Carne moída. Miúdos.	---	---	---
c) Carnes preparadas cruas congeladas ou não (porções controladas, bifés, cubos, tiras de carne e assemelhados).	---	---	---
d) Produtos cárneos crus resfriados ou congelados (lingüiças em geral, hambúrguer, almôndegas, quibes e outros).	$5 \times 10^2/g$	$5 \times 10^2/g$	$10^3/g$
e) Produtos cárneos cozidos defumados ou não (mortadela, salsicha, presunto, fiambre, morcela e outros, inclusive os fatiados no local de produção).	$5 \times 10/g$	$5 \times 10/g$	$10^2/g$
f) Produtos cárneos defumados (barriga, costela, lombo e outros).	$10^2/g$	$5 \times 10/g$	$10^2/g$
g) Produtos cárneos maturados: - presuntos crus, copa e outros; - salames.	$10^2/g$ $10^2/g$	$5 \times 10/g$ $5 \times 10/g$	$10^2/g$ $10^3/g$
h) Produtos cárneos salgados (lombos, pés, rabos, orelhas e outros, e charque).	$10^2/g$	$5 \times 10^2/g$	$5 \times 10^2/g$

Fonte: BRASIL, 1998, p. 5-6 (modificado).

APÊNDICE

TABELA 9 Identificação das amostras com seus respectivos locais de coleta e data, assim como seu respectivo cardápio oferecido na merenda escolar.

AMOSTRA	LOCAL	CARDÁPIO	DATA
1	EMVMNS*	Cachorro-quente	11.08.99
2	EMPDSM ⁺	Sopa (legumes e carne)	11.08.99
3	EMVMNS	Carne seca com abóbora	18.08.99
4	EMPDSM	Cachorro-quente	18.08.99
5	EMVMNS	Sopa de macarrão com carne	24.08.99
6	EMPDSM	Sopa (legumes e carne)	24.08.99
7	EMVMNS	Cachorro-quente	31.08.99
8	CESD*	Sopa (legumes e carne)	08.09.99
9	CESD	Macarrão com salsicha	14.09.99
10	CEHAP [♦]	Carne seca com abóbora	04.10.99
11	CEHAP	Sopa (legumes e carne)	20.10.99
12	CESD	Macarrão com carne moída	04.11.99
13	CESD	Carne seca com abóbora	22.11.99
14	CEHAP	Carne seca com abóbora	24.11.99
15	CEHAP	Carne picada com vagem	25.11.99
16	EMPDSM	Macarrão com carne moída	25.11.99
17	EMPDSM	Cachorro-quente	26.11.99
18	CESD	Carne com batata	07.12.99
19	EMVMNS	Cachorro-quente	08.12.99
20	EMPDSM	Sopa (legumes e carne)	09.12.99
21	CEHAP	Carne ensopada	13.12.99
22	EMVMNS	Carne ensopada	15.12.99

* Escola Municipal Vereador Manoel Novis da Silva (Tanguá-RJ).

⁺ Escola Municipal Professora Dearina Silva Machado (Tanguá-RJ).

* Colégio Estadual Santos Dias (São Gonçalo-RJ).

[♦] Colégio Estadual Hilka de Araújo Peçanha (Itaboraí-RJ).

TABELA 10 Resultado da determinação do Número Mais Provável (NMP/g) de Coliformes Fecais das amostras de carne crua (CR), carne cozida (CZ), *swab* de mãos (SM) e *swab* de utensílio (SU).

AMOSTRA	Coliformes Fecais (NMP/g)			
	CR	CZ	SM	SU
1	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
2	2,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
3	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	7,5 x 10	< 0,3 x 10
4	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	0,4 x 10	< 0,3 x 10
5	4,6 x 10²	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
6	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
7	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
8	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
9	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
11	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
12	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
13	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
14	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
15	0,9 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
16	7,5 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
17	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
18	9,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
19	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
20	1,5 x 10²	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
21	1,1 x 10³	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
22	> 1,1 x 10³	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10

TABELA 11 Resultados da determinação do Número Mais Provável (NMP/mL) de Coliformes Totais e Fecais de amostras de água de abastecimento das instituições de ensino que foram analisadas.

AMOSTRA DE ÁGUA	Coliformes Totais (NMP/mL)	Coliformes Fecais (NMP/mL)
1	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
2	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
3	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
4	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
5	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
6	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
7	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
8	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
9	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
11	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
12	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
13	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
14	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
15	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
16	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
17	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
18	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
19	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
20	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
21	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
22	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10

TABELA 12 Relação das amostras onde ocorreram Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Fecais com a percentagem de UFC identificadas bioquimicamente como *Escherichia coli*.

AMOSTRAS	CARNE CRUA			SWAB DE MÃOS		
	Coliformes Fecais	<i>Escherichia coli</i> (%)		Coliformes Fecais	<i>Escherichia coli</i> (%)	
	NMP/g	+	-	NMP/g	+	-
2	2,3 x 10	0%	100%	---	---	---
3	---	---	---	7,5 x 10	0%	100%
4	---	---	---	0,4 x 10	0%	100%
5	4,6 x 10 ²	83,3%	16,7%	---	---	---
15	0,9 x 10	0%	100%	---	---	---
16	7,5 x 10	0%	100%	---	---	---
18	9,3 x 10	60%	40%	---	---	---
20	1,5 x 10 ²	0%	100%	---	---	---
21	1,1 x 10 ³	62,5%	37,5%	---	---	---
22	> 1,1 x 10 ³	100%	0%	---	---	---

GRÁFICO 1 Relação das amostras contaminadas com Coliformes Fecais usando a técnica do Número Mais Provável (NMP/g) e percentagem de UFC identificadas como *Escherichia coli*.

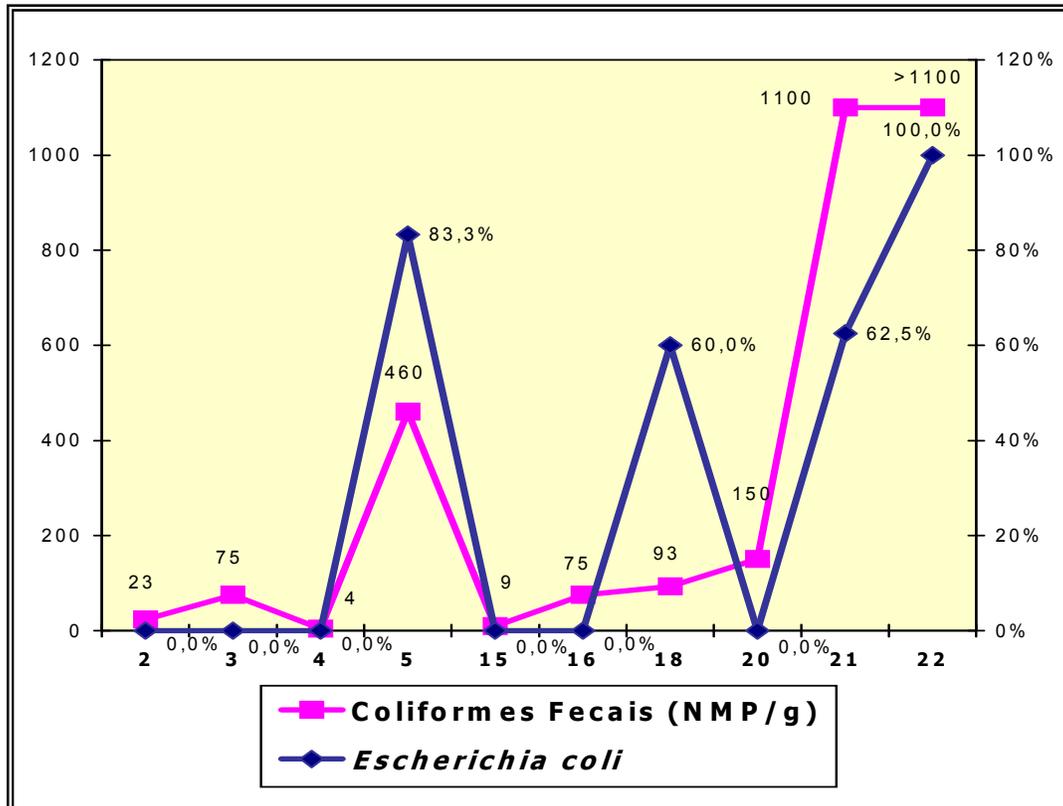


GRÁFICO 2 Percentagem dos resultados da identificação bioquímica de *Escherichia coli*, sugerindo 56,72% de *E. coli* positivas versus 43,28% de outras *Enterobacteriaceae*.

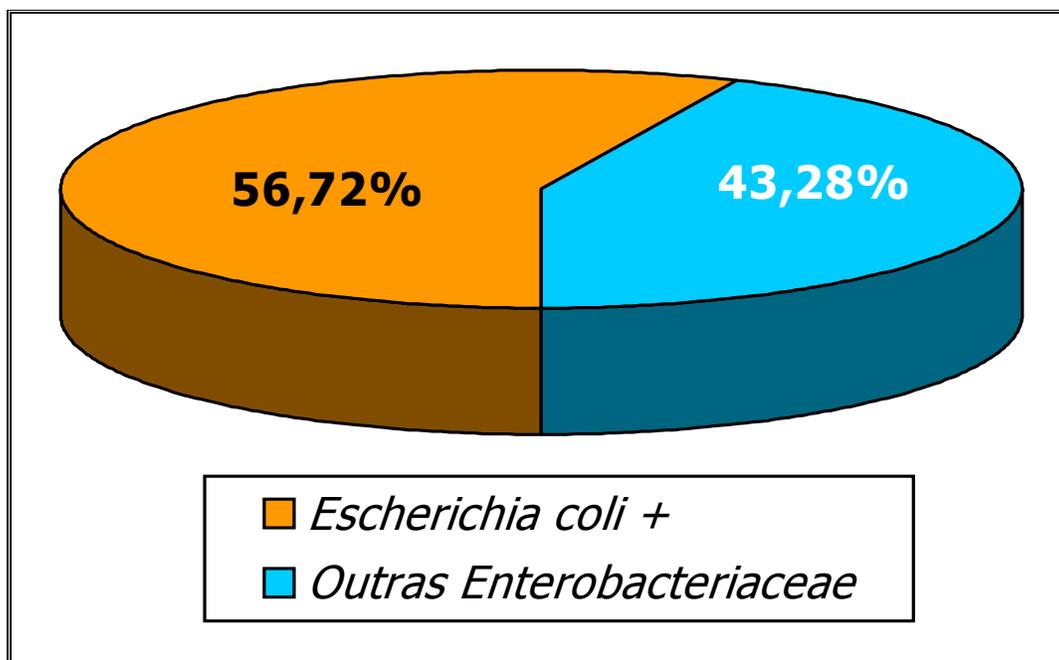


GRÁFICO 3 Percentagem dos resultados da identificação bioquímica de *Staphylococcus*, sugerindo 38,26% de *Staphylococcus* positivas versus 61,74% que não foram identificadas como tais.

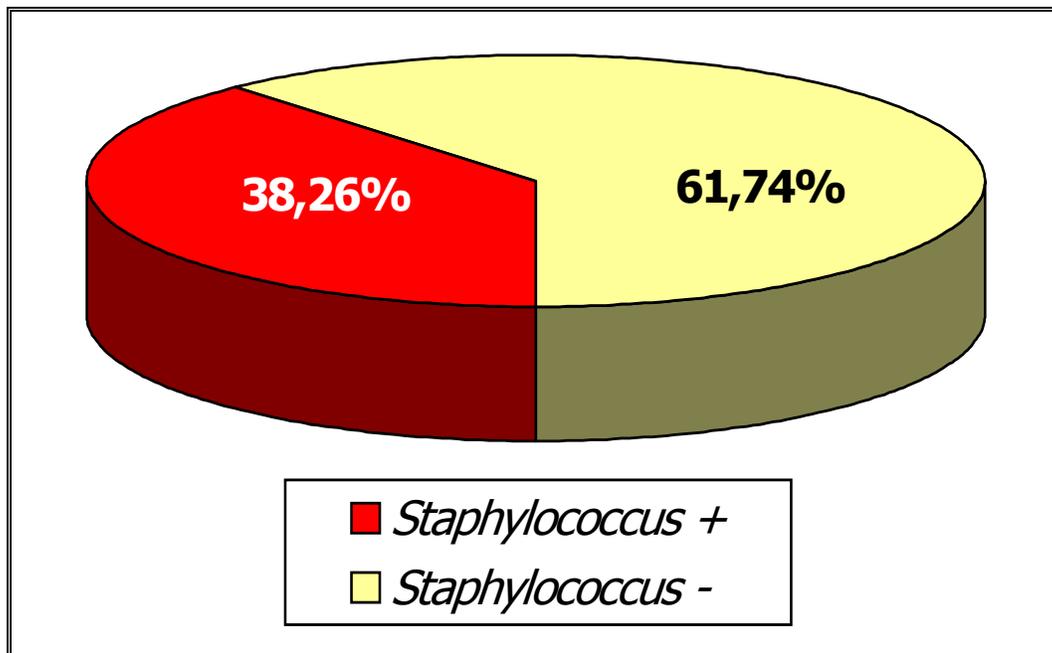


GRÁFICO 4 Percentagem das interpretações e conclusões das análises microbiológicas das amostras de carne crua analisadas, em relação ao Número Mais Provável (NMP/g) de Coliformes Fecais.

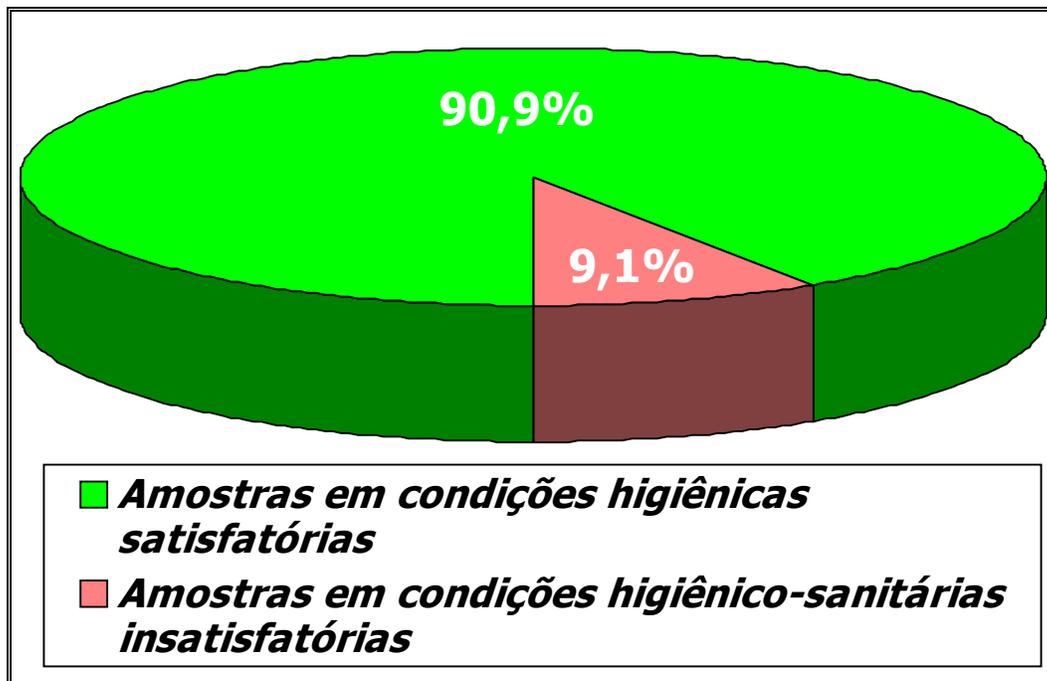
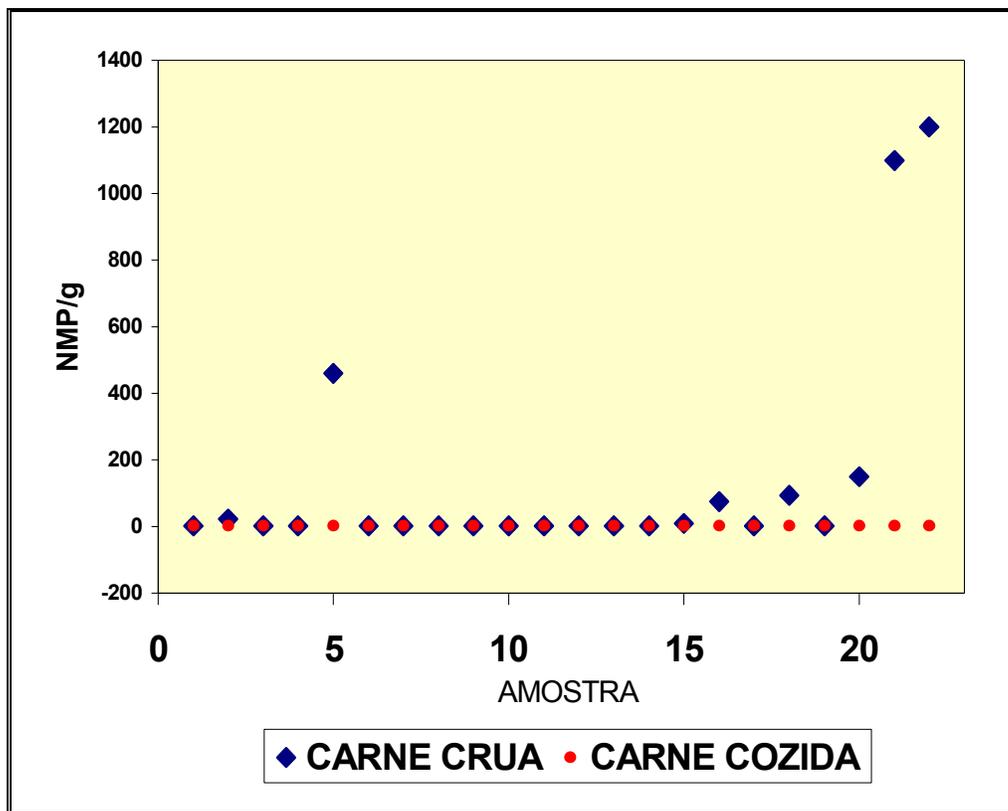


GRÁFICO 5 Coeficiente de correlação entre amostras de carne crua e carne cozida.

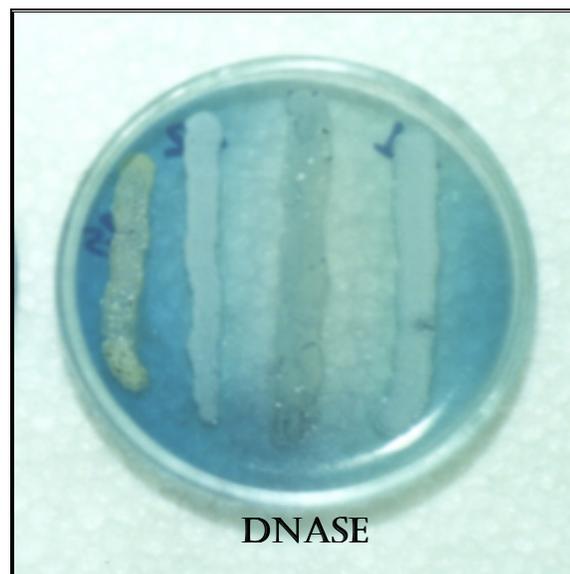


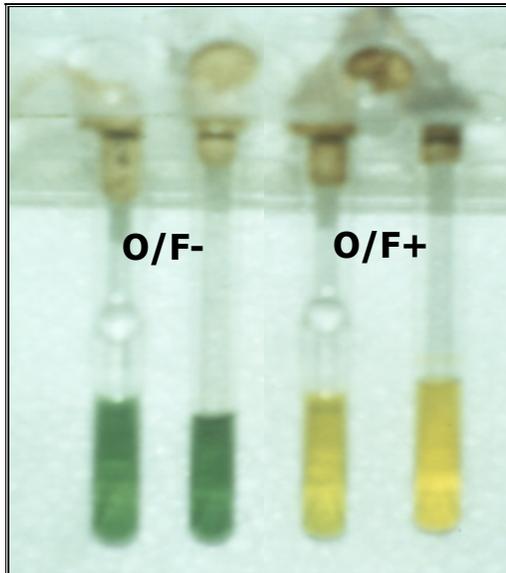
**FIGURA 1**

Placa de TBD para a prova de termonuclease, apresentando ao centro prova positiva (cepa padrão de *S. aureus*, *American Type Culture Collection* (ATCC) 25923) e em torno, cultivos com resultados negativos para esta prova.

FIGURA 2

Prova de DNase positiva (cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923) caracterizada pela presença de um halo rosa claro em torno da estria.

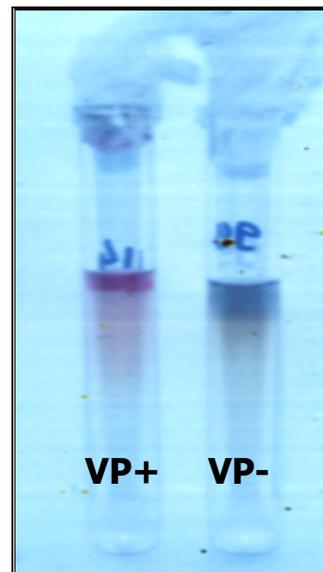


**FIGURA 3**

Tubos com meio Oxidação e Fermentação (O/F) *Hugh-Leifson*, com interpretação da prova via oxidativa ou fermentativa. Resultados negativos (verdes) e positivos (amarelos) para oxidação e fermentação de carboidratos.

FIGURA 4

Tubos apresentando resultados positivos e negativos, respectivamente, para prova de *Voges-Proskauer* (VP).

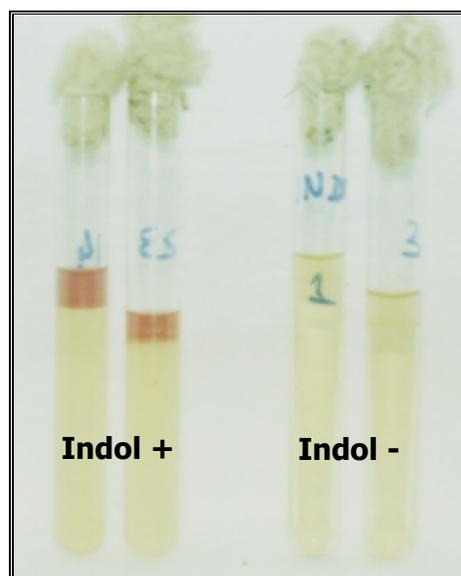


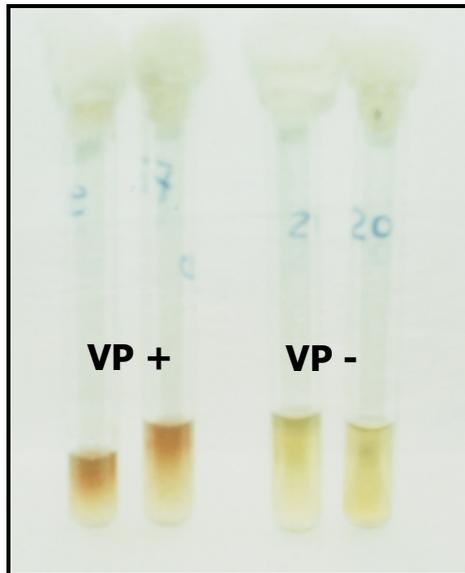
**FIGURA 5**

Cepas padrões usadas para comparação das características morfológicas das cepas em meios seletivos/indicadores e provas bioquímicas.

FIGURA 6

Tubos contendo Caldo Tripton a 1%. Formação de halo vermelho na superfície do meio (positivo), devido a reação do triptofano formando o indol (produção de enzima triptofanase). As cepas de *E. coli* são indol positivo ou negativo.

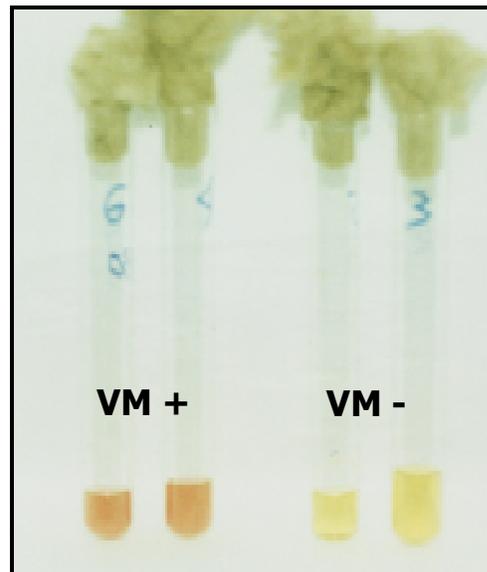


**FIGURA 7**

Tubos positivos e negativos, respectivamente para o teste de *Voges-Proskauer* (VP). As cepas características de *E. coli* são VP negativas.

FIGURA 8

Tubos positivos e negativos, respectivamente, para o Teste do Vermelho de Metila (VM). As cepas de *E. coli* são VM positivas.



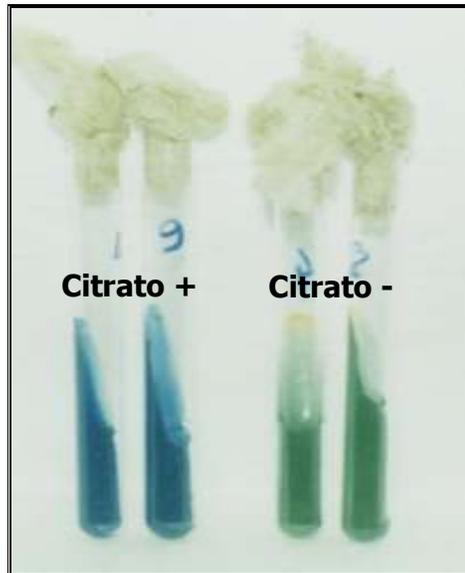
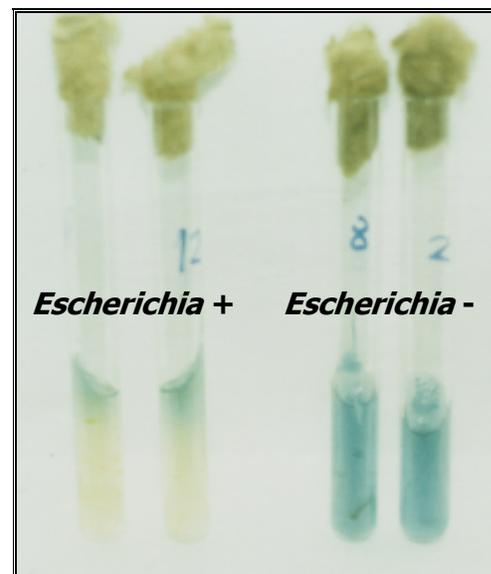


FIGURA 9

Tubos contendo Agar Citrato de Simmons inclinado. Viragem para cor azul (positivo), devido a produção de citratase que desdobra o citrato e amônia. As cepas de *E. coli* são citrato negativo.

FIGURA 10

Meio EPM para identificação de enterobactérias. Para o gênero *Escherichia*, a superfície torna-se azul ou amarela e a base amarela. Não ocorre produção de H_2S e produção de gás pode ser positiva ou negativa.



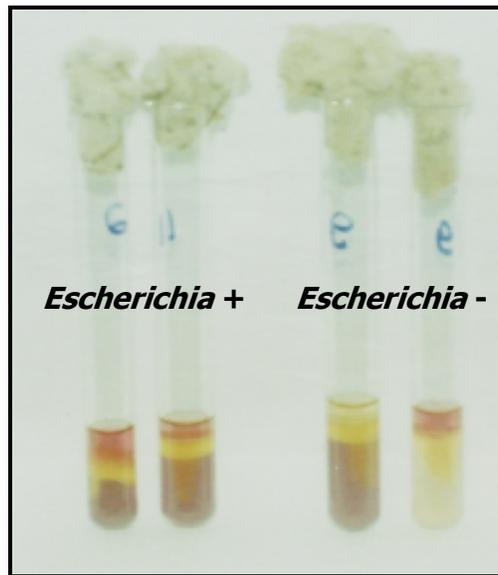


FIGURA 11

Meio MILi, para identificação de enterobactérias, indicando os testes de motilidade, produção de indol e lisina descarboxilase. As cepas do gênero *Escherichia* são motilidade positiva; indol positivo ou negativo e lisina positiva.

F 745

Fortuna, Jorge Luiz

Aspectos higiênico-sanitários no preparo de carne bovina servida nas refeições escolares (merenda escolar) em instituições municipais e estaduais de ensino no Estado do Rio de Janeiro / Jorge Luiz Fortuna - Niterói. [s.n.], 2000.

152 f.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Carnes) - Universidade Federal Fluminense, 2000.

Orientador: M.S. Prof. Robson Maia Franco.

1. Carne Bovina - Bacteriologia. 2. Higiene - Merenda Escolar. I. Título.

CDD 664.9297