UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

CRISTIANE SEVERO PLATTE

Cronobacter spp. E OUTRAS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS: AVALIAÇÃO DA PRESENÇA E SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DAS ESTIRPES ISOLADAS EM PRODUTOS LÁCTEOS

NITERÓI
2014

CRISTIANE SEVERO PLATTE

Cronobacter spp. E OUTRAS BACTÉRIAS PATÓGENAS: AVALIAÇÃO DA PRESENÇA E SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DAS ESTIRPES ISOLADAS EM PRODUTOS LÁCTEOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO

NITERÓI
2014

CRISTIANE SEVERO PLATTE

Cronobacter spp. E OUTRAS BACTÉRIAS PATÓGENAS: AVALIAÇÃO DA PRESENÇA E SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DAS ESTIRPES ISOLADAS EM PRODUTOS LÁCTEOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO - Orientador - UFF

Prof. Dr. MARCO ANTONIO SLOBODA CORTEZ - UFF

Profª. Drª. KAREN SIGNORI PEREIRA – UFRJ

Niterói – RJ
2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo todos os dias. Por permitir ter o que quis e o que não queria ter e assim me tornar um pouquinho melhor a cada dia.

Ao meu querido pai *(in memorian*) que me ensinou a lutar por meus ideais por mais difíceis que fossem os obstáculos, por sua alegria irradiante que muito me faz falta, por seu amor e amizade.

À minha mãe por seu apoio incondicional, por valorizar e incentivar os meus desejos. Pelo carinho por minha família.

Ao meu marido Eduardo Barcelos Platte meu grande amor, meu amigo, por cuidar tão bem do nosso filho, enquanto eu estudava. Por me fazer acreditar na minha capacidade e por incentivar meus sonhos e fazer com que sejam realizados.

Ao meu filho Gustavo Severo Platte por continuar me amando mesmo eu estando ausente para me dedicar aos estudos. Por seu carinho, amor e ensinamentos tão valiosos. Obrigada por existir e encher de alegria os meus dias. Meu amor você é o ser mais importante na minha vida!

Aos amigos queridos Flávia Calixto e André Medeiros por tantos momentos especiais juntos que deixaram histórias para contar.

Aos professores do curso da Pós Graduação pelos ensinamentos transmitidos em especial ao prof. Dr. Marco Antônio Sloboda Cortez, e à Prof^{a}. Dr^{a}. Eliana Mesquita.

A todos da Pós-Graduação pelo seu trabalho, orientação, por permitir que este curso aconteça.

Ao apoio financeiro e incentivo à pesquisa dispensados pela CAPES e FOPESQ.

À banca examinadora pela disposição em participar do aprimoramento deste estudo com seus conhecimentos e sugestões.

Finalmente, dedico este trabalho ao meu estimado orientador Prof Dr. Robson Maia Franco, meu MESTRE sem você nada teria acontecido! Obrigada pelo incentivo, ensinamentos, confiança e por estar sempre presente e disposto a me ajudar. Agradeço por sua amizade, dedicação, pelo profissionalismo ímpar e por sua generosidade. Você foi uma das bênçãos que Deus colocou na minha vida. Mais uma vez muito obrigada!

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito".

Chico Xavier

RESUMO

Este estudo foi realizado com o intuito de fornecer informações sobre a qualidade bacteriológica de alimentos lácteos, Fórmulas Infantis e queijo Minas Frescal, avaliando a presença de bactérias patógenas e sua suscetibilidade aos agentes antimicrobianos, em especial a *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) pelo seu alto poder nocivo às crianças de primeira idade e aos imunossuprimidos. As matrizes alimentícias utilizadas como exemplares de produtos lácteos foram amostras de Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) e queijo Minas Frescal (MF). Foram utilizados métodos tradicionais para identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Bacillus cereus* e métodos cromogênicos para avaliação rápida de *Cronobacter* spp., *E. coli*, seus patotipos (EPEC, ETEC, EHEC,O157) e *Salmonella* spp. Para a identificação de *Cronobacter* spp utilizou-se o meio Ágar HiCrome™ *Cronobacter* spp. modificado em substituição ao Ágar de Isolamento de *E. sakazakii* (ESIA) empregado no método tradicional. Além desta modificação, realizou-se a incubação utilizando duas temperaturas diferentes, a 36±1℃/24h e a 44±0,5℃/24h com o intuito de avalia r o fator temperatura sob o crescimento do microrganismo. Foram analisadas 30 amostras de Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) destinadas a crianças até um ano de idade e 30 amostras de queijo Minas Frescal (MF), adquiridas nos estabelecimentos comerciais da cidade de Niterói, RJ. Nos resultados foram evidenciaram que em 30 amostras de queijo Minas Frescal analisadas, 50% estavam contaminadas com *E. coli*, 26,67% por *Staphylococcus* coagulase positiva**,** em 16,67% foi constatada a presença de *Salmonella* spp. e *Bacillus cereus* e 43,33% estavam contaminadas por *Cronobacter* spp. Para as 30 amostras de Fórmula Infantis Desidratadas**,** 10% estavam contaminadas por coliformes a 35℃ com valores superiores ao determinado pela legislação, igualmente, 3,33% por coliformes termotolerantes, onde 100% dos patotipos encontrados foram EPEC e os sorogrupos isolados foram O114 e O158. Em relação à suscetibilidade antimicrobiana, 70% das estirpes isoladas em FID, possuíam multirresistência aos antimicrobianos utilizados e em 92,7% das estirpes isoladas em queijo Minas Frescal foram encontradas as mesmas características. Os resultados obtidos dos isolamentos de *Cronobacter* spp. nas temperaturas avaliadas levam a interpretação de que algumas estirpes tanto em queijo MF, quanto nas FID desenvolveram-se apenas na temperatura de 36 ± 1℃,

outras apenas na temperatura de 44℃ ± 0,5℃, deixa ndo claro que as duas temperaturas devem ser consideradas no processo de isolamento.

Palavras-chave: Fórmulas infantis, queijo Minas Frescal, Bactérias, Derivados de Leite

.

ABSTRACT

This study was conducted in order to provide information on the bacteriological quality of milk food, infant formula and Minas Frescal cheese, evaluating the presence of pathogenic bacteria and their susceptibility to antimicrobial agents, especially *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) for its high harmful for children in early age and immunosuppressed power. The food matrix used as exemplars of dairy samples were Powdered Infant Formula (PIF) and Minas Frescal cheese (MF). Traditional methods for identifying *Staphylococcus* coagulase-positive and *Bacillus cereus* and chromogenic methods for rapid screening of *Cronobacter* spp. were used. *E. coli*, its pathotypes (EPEC, ETEC, EHEC O157) and *Salmonella* spp. To identify *Cronobacter* spp. used the agar HiCrome ™ *Cronobacter* spp. modified to replace Agar Isolation of *E*. *sakazakii* (ESIA) employed in the traditional method. Apart from this modification was carried out using two different incubation temperatures, 36±1℃/24h and 44±0.5℃/24h in order to evaluate the temperature factor in the growth of the microorganism. 30 samples of Powdered Infant Formula (PIF) intended for children under one year of age and 30 samples of Minas Frescal cheese (MF), acquired in the shops of the city of Niterói, RJ were analyzed. The results showed that in 30 of Minas Frescal cheese samples analyzed, 50% were contaminated with *E. coli*, 26.67% by *Staphylococcus* coagulase positive in 16.67% showed the presence of *Salmonella* spp. and *Bacillus cereus* and 43.33% were contaminated with *Cronobacter* spp. For Infant Formula 30 Dried samples of 10% were contaminated with coliforms at 35 °C with the higher values determined by legislation, also 3.33% by coliforms , where 100% of EPEC pathotypes have been found and isolated serogroups were O114 and O158 . Concerning antimicrobial susceptibility , 70 % of the strains isolated in FID , had multidrug resistance to antimicrobial agents and 92.7 % of the strains isolated in Minas cheese were found the same characteristics . The results of isolates of Cronobacter spp . evaluated at temperatures lead to the interpretation that some strains in both MF cheese , as in FID developed only at the temperature of 36 ± 1℃, but other temperature 44℃ ± 0.5℃ , making it clear that the two temperatures should be considered in the isolation process .

Key words: *Infant formulas, Minas Frescal cheese, Bacteria, Derivatives Milk*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS, p.4

RESUMO, p.6

ABSTRACT, p.8

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p.12

LISTA DE TABELAS, p.16

LISTA DE ABREVEATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p.18

1 **INTRODUÇÃO**, p.21

2 **OBJETIVOS**, p.23

2.1 OBJETIVOS GERAIS, p.23

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p.23

3 **REVISÃO DE LITERATURA**, p.24

3.1 SEGURANÇA ALIMENTAR, p.24

3.2 DOENÇAS ALIMENTARES, p.25

3.3 MICRORGANISMOS INDICADORES DA QUALIDADE E INOCUIDADE DOS ALIMENTOS, p.26

3.4 PRODUTOS LÁCTEOS, p.28

3.4.1 **Fórmulas infantis**, p.28

3.4.1.1 Processamento industrial das fórmulas infantis em pó, p.29

3.4.2 **Queijo Minas Frescal**, p.33

3.4.2.1 Processamento industrial do queijo Minas Frescal, p.34.

3.5 CARACTERÍSTICAS DOS MICRORGANISMOS, p.36

3.5.1 ***Escherichia coli***, p.36

3.5.2 ***Saphylococcus* coagualse positiva**, p.38

3.5.3 ***Bacillus cereus***, p.39

3.5.4 ***Salmonella*** spp., p.40

3.5.5 ***Cronobacter*** spp. (*Enterobacter sakasakii*), p.42

3.6 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS, p.46

3.7 ASPECTOS REGULATÓRIOS, p.47

4 **MATERIAL E MÉTODOS**, p.51

4.1 MATERIAL, p.51
4.2 MÉTODOS, p.51
4.2.1 **Colheita de amostras e transporte**, p.51
4.2.2 **Identificação das amostras**, p.51
4.2.3 **Preparo das subamostras para procedimento analítico**, p.52
4.3 ANÁLISES, p.52
4.3.1**Análises bacteriológicas**, p.52
4.3.1.1 Isolamento de coliformes totais, *Escherichia coli* (EC) e sorologia, p.52
4.3.1.2 Contagem e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva, p.55
4.3.1.3 Contagem e identificação de *Bacillus cereus*, p.57
4.3.1.4 Isolamento e identificação de *Salmonella* spp., p.58
4.3.1.5 Detecção de *Cronobacter* spp., p.61
4.3.2 **Avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos**, p.63
4.3.3 **Avaliação estatística**, p.64
5 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**, p.65
5.1 COLIFORMES TOTAIS, e *E. coli,* p.65
5.2 *Staphylococcus* coagulase positiva, p.71
5.3 *Salmonella* spp., p.75
5.4 *Bacillus cereus,* p.79
5.5 *Cronobacter* spp., p.83
6 **CONCLUSÕES,** p.91
7 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, p.93
8 **APÊNDICES,** p.106.
9 **ANEXOS,** p.116.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1: Comparação entre a sensibilidade dos agentes antimicrobianos para *Cronobacter* spp. para a qual houve diferença significativa entre a sensibilidade das estirpes encontradas em queijo MF e FID, p.111.

Quadro 2: Comparação entre a sensibilidade dos agentes antimicrobianos para *E. coli* para a qual houve diferença significativa entre a sensibilidade das estirpes encontradas em queijo MF e FID, p.112.

Quadro 3: Comparação entre a sensibilidade dos agentes antimicrobianos para *Staphylococcus* coagulase positiva para a qual houve diferença significativa entre a sensibilidade das estirpes encontradas em QMF e FID, p. 113.

Quadro 4: Comparação entre a sensibilidade dos agentes antimicrobianos para *Bacillus cereus* para a qual houve diferença significativa entre a sensibilidade das estirpes encontradas em queijo MF e FID, p.114.

Quadro 5: Comparação entre a sensibilidade dos agentes antimicrobianos para *Salmonella* spp. para a qual houve diferença significativa entre a sensibilidade das estirpes encontradas em queijo MF e FID, p.115.

Fig. 01: Processamento industrial das fórmulas infantis em pó - Processo úmido, p.32

Fig. 02: Processo Industrial do Queijo Minas Frescal, p.35.

Fig. 03: Queijo Minas Frescal em recipientes de plástico prontas para a viragem e em embalagem primária. Estágio supervisionado Junho de 2007, p. 36.

Fig. 04: Pesagem e preparo das amostras de queijo MF e FID. LCMPOA/UFF/2013, p. 52.

Fig. 05: Meio “Rapid Hicoliform” - LCMPOA/UFF/2013, p. 53

Fig. 06: Fluorescência : Indicativo de *E. coli*. - LCMPOA/UFF/2013, p. 53

Fig. 07: Formação de Indol – *E. coli* - LCMPOA/UFF/2013, p.53

Fig. 08: Descrição Esquemática da Análise: Colimetria – Metodologia Cromogênica, p. 54

Fig. 09: Culturas, soros e placa para soroaglutinação - LCMPOA/UFF/2013, p. 55.

Fig. 10: Amostra com aglutinação positiva - LCMPOA/UFF/2013, p. 55.

Fig. 11: Amostra com aglutinação negativa - LCMPOA/UFF/2013, p. 55.

Fig. 12: Isolamento de *Staphylococcus* coagulase positiva em meio BP. LCMPOA/UFF/2013, p. 56.

Fig. 13: Prova da catalase para *Staphylococcus* coagulase positiva LCMPOA/UFF/2013, p. 56.

Fig. 14: Prova da coagulase para *Staphylococcus* coagulase positiva LCMPOA/UFF/2013, p. 56.

Fig. 15: A Meio MYP – *Bacillus cereus* - LCMPOA/UFF/2013, p. 58.

Fig. 16: Aspectos morfotintoriais do *Bacillus cereus*- LCMPOA/UFF/2013, p. 58.

Fig. 17: Meio MYP – contagem de *Bacillus cereus* - LCMPOA/UFF/2013, p. 58.

Fig. 18: Isolamento de *Salmonella* spp meio “Rapid Hicoliform”. LCMPOA/UFF/2013, p. 58.

Fig. 19: Isolamento de *Salmonella* spp meio “Rapid Hicoliform”. LCMPOA/UFF/2013, p. 58.

Fig. 20: Colônia transparente sugestivo para *Salmonella* spp. Meio “Rapid Hicoliform”. LCMPOA/UFF/2013, p. 58.

Fig. 21: Isolamento de *Cronobacter* spp.(Colônias azuis) Meio “HiCrome™ *Cronobacter* spp”. Modificado. LCMPOA/UFF/2013, p. 62.

Fig. 22: "HiCrome™ *Cronobacter* spp". Modificado. LCMPOA/UFF/2013, p. 62.

Fig. 23: Frequência dos alimentos em não conformidade com padrões fixados para a presença de *E. coli*, p.68

Fig. 24: Frequência dos alimentos em não conformidade com padrões fixados para contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva, p.73.

Fig. 25: Frequência dos alimentos em não conformidade com padrões fixados para *Salmonella* spp., p.76.

Fig. 26: Frequência dos alimentos em não conformidade com padrões fixados para contagens de *Bacillus cereus*, p.81.

Fig. 27: Frequência dos alimentos em não conformidade com padrões fixados para *Cronobacter* spp., p.87.

Fig. 28: Padrão de agrupamento dos antimicrobianos testados para *Cronobacter* spp. em amostras de queijo MF (A) e FID (B), mostrando padrão de comportamento distinto. O círculo vermelho representa os antimicrobianos com maior sensibilidade, p.111.

Fig. 29: Padrão de agrupamento dos antimicrobianos testados para *E. coli* em amostras de queijo MF (A) e FID (B), mostrando padrão de comportamento distinto. O círculo vermelho representa os antimicrobianos com maior sensibilidade, p.112.

Fig. 30: Padrão de agrupamento dos antimicrobianos testados para *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de queijo MF (A) e FID (B), mostrando padrão de comportamento distinto. O círculo vermelho representa os antimicrobianos com maior sensibilidade, p.113.

Fig. 31: Padrão de agrupamento dos antimicrobianos testados para *Bacillus cereus* em amostras de queijo MF (A) e FID (B), mostrando padrão de

comportamento distinto. O círculo vermelho representa os antimicrobianos com maior sensibilidade, p. 114.

Fig. 32: Padrão de agrupamento dos antimicrobianos testados para *Salmonella* spp. em amostras de queijo MF (A) e FID (B), mostrando padrão de comportamento distinto. O círculo vermelho representa os antimicrobianos com maior sensibilidade, p. 115.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resultado das contagens e sorologia de coliformes totais e *E.coli* realizadas em queijo Minas Frescal (MF), p. 65.

TABELA 2 - Resultado das contagens e sorologia de coliformes totais e *E.coli* realizadas em Fórmulas Infantis Desidratadas (FID), p.67.

TABELA 3 - Comportamento das dez estirpes de *E. coli* patogênicas isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID), p. 68.

TABELA 4 - Resultado das contagens e bioquímica de *Staphylococcus* coagulase positiva realizadas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID), p. 71.

TABELA 5 - Comportamento das estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva Isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) perante aos antimicrobianos, p. 73.

TABELA 6 - Resultado do isolamento de *Salmonella* spp. em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID), p.75.

TABELA 7 - Comportamento das dezesseis estirpes de *Salmonella* spp. isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) perante aos antimicrobianos, p. 76.

TABELA 8 - Resultado das contagens e provas bioquímicas de *Bacillus cereus* realizadas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID), p. 79.

TABELA 9 - Comportamento das estirpes de *Bacillus cereus* isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) perante aos antimicrobianos, p. 81.

TABELA 10 - Resultado do isolamento de *Cronobacter* spp. realizado em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID), p. 83.

TABELA 11 - Resultado das Provas Bioquímicas para *Cronobacter* spp. realizadas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID), p.86.

TABELA 12 - Comportamento das estirpes de *Cronobacter* spp Isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) perante aos antimicrobianos, p. 88.

TABELA 13 - Comportamento das estirpes de *E.coli*. isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e em Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) aos antimicrobianos testados, p.106.

TABELA 14 - Comportamento das estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e em Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) aos antimicrobianos testados, p.107.

TABELA 15 - Comportamento das estirpes de *Salmonella* spp. isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e em Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) aos antimicrobianos testados, p.108.

TABELA 16 - Comportamento das estirpes de *Bacillus cereus* isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e em Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) aos antimicrobianos testados, p.109.

TABELA 17 - Comportamento das estirpes de *Cronobacter* spp. isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e em Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) aos antimicrobianos testados, p.110.

TABELA 18 - Perfil bioquímico da *E. Sakazakii* e outras bactérias da família Enterobacteriaceae – percentual de estirpes positivas para cada prova, p.116

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% Porcentagem

℃ Graus Celcius

>: Maior

AMI: Amicacina

AMP: Amplicilina

ATM: Aztreonam

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APHA: ”Standart Methods of the Examination of Water and Waster Water”

Atm: Atmosferas

BHAM: Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas

Ca: Cálcio

CAC: “Codex Alimentarius Comission”

CAZ: Ceftazidina

CDC: “Centers for Disease Control and Prevention”

CFL: Cefalotina

CFO: Cefoxitina

CLIN: Clindamicina

CLO: Cloranfenicol

CLST: “Clinical and Laboratory Standards Institute”

CRO: Ceftriaxona

CTX: Cefotaxima

DTA: Doença(s) Transmitida(s) por Alimento(s)

EDTA: Etileno-Diamino-Tetracético

EIEC: Grupo patogénico de *Escherichia coli*– enteroinvasivo

EPEC: Grupo patogénico de *Escherichia coli*– enteropatogénico

ERI: Eritromicina

ESIA: *Enterobacter sakazakii* “isolation agar” (Laboratoires AES™)

EST: Extrato Seco Total

ETEC: Grupo patogénico de *Escherichia coli*– enterotoxigénico

EUA: Estados Unidos da América

FAO: “Food and Agriculture Organization”

FAO/WHO: “Food and Agriculture Organization/World Health Organization”

FDA: “Food and Drug Administration”

FI: Fórmula(s) Infantil(s)

FID: Fórmula Infantil Desidratada

g: Grama

G-: Gram negativo

GEN: Gentamicina

h: Hora

HEPA: High Efficiency Particulate Air

H_2S: Ácido Sulfídrico

ICMSF: “International Commission on Microbiological Specifications for Foods”

IN: Instrução Normativa

ISO: “International Organization for Standardization”

Kg: Kilograma

LACEN: Laboratório de Enterobactérias

LCMPOA/UFF: Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da Universidade Fluminense

LRNCEB: Laboratório de Referência Nacional de Cólera e Enterobactérias

LTDA: Limitada

m^2: Metro Quadrado

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

Mili: Motilidade, Indol, Lisina Descarboxilase

mL: Mililitro

mm: Milímetro

NMP: Número Mais Provável

OIE: “World Organization for Animal Health”

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPAS: Organização Pan Americana da Saúde

OXA: Oxacilina

P: Fósforo

PEN: Penicilina

pH: Potencial de Hidrogênio

PIF: “Powdered Infant Formula”

SBCTA: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos

RIISPOA: Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal

RIMSA: Reunião Internacional de Saúde Ambiental em Nível Ministerial

SIF: Serviço de Inspeção Federal

SIM: Sulfeto Indol Motilidade

TEC: Teicoplamina

TET: Tetraciclina

TGI: Trato Gastro Intestinal

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UHT: “Ultra-High-Temperature”

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, inúmeros pesquisadores realizaram estudos, objetivando minimizar os danos causados pela contaminação dos alimentos por estirpes patogênicas durante a fabricação de matrizes alimentícias, armazenamento ou consumo. Na maioria dos resultados encontrados é possível inferir que a contaminação está diretamente relacionada com as falhas de higienização, dos autocontroles, das boas práticas de fabricação, armazenamento, comercialização e consumo.

Este cenário vem transformando-se com os esforços em conjunto dos órgãos de saúde, vigilância sanitária, indústria e comércio, aliados à comunidade científica para atender um consumidor exigente por produtos de qualidade e idoneidade comprovada.

No entanto, muitos casos relacionados às doenças alimentares são notificados anualmente e os agentes causadores os mais diversos possíveis. Ainda faltam dados científicos que esclareçam resultados incongruentes, em especial, relacionados aos patógenos emergentes como é o caso da *Cronobacter* spp.

No Brasil existem poucos estudos publicados sobre a ocorrência deste microrganismo em FID ou no ambiente de preparo destas fórmulas. Pouco se sabe sobre seu comportamento nas condições rotineiras de preparo e estocagem das fórmulas preparadas em lactários. Do mesmo modo, o conhecimento da metodologia analítica não está difundido entre os Laboratórios Oficiais de Saúde Pública – Lacen brasileiros, que executam as análises laboratoriais de natureza fiscal para o monitoramento de produtos disponíveis no comércio e as análises necessárias ao esclarecimento dos surtos de agentes etiológicos de doenças alimentares.

Métodos para detecção rápida com viabilidade econômica devem ser desenvolvidos, pois no Brasil há pretensão de avançar na implantação de ferramentas que permitam a redução do risco à saúde coletiva, causado pelo consumo de alimentos contaminados com *Cronobacter* spp. com a finalidade de assegurar a oferta de alimentos seguros e facilitar o comércio internacional.

No presente trabalho, pesquisou-se, além da microbiota exigida pela legislação brasileira para produtos lácteos, o *Cronobacter* spp., motivados por sua importância como patógeno emergente, que não está na lista de exigências dos padrões microbiológicos para alimentos infantis, apesar de ser o agente etiológico implicado em muitos surtos alimentares com alta taxa de mortalidade.

1 **OBJETIVOS**

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de *Cronobacter* spp. e outras bactérias patógenas indicadoras da qualidade microbiológica dos produtos lácteos selecionados, Fórmulas Infantis e queijo Minas Frescal, adquiridos no município de Niterói-RJ e pesquisar a susceptibilidade antimicrobiana das estirpes isoladas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Detectar estirpes de *Cronobacter* spp .(antigo *Enterobacter sakazakii), E. coli*, seus patotipos (EPEC, ETEC, EHEC, O157) e *Salmonella* spp., utilizando métodos cromogênicos para avaliação rápida.

Isolar estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Bacillus cereus*, utilizando métodos tradicionais (BRASIL, 2003).

Avaliar a suscetibilidade das estirpes isoladas de *Cronobacter* spp. *Salmonella* spp., *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Bacillus cereus* aos agentes antimicrobianos comumente utilizados nos tratamentos de doenças infecciosas;

Verificar se as amostras das Formulas Infantis e de queijo Minas Frescal estavam dentro dos padrões microbiológicos exigidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, conforme a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001);

Constatar a influência da temperatura de incubação (36℃ ± 1℃ 44℃ ± 0,5℃) no desenvolvimento da *Cronobacter* spp.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 SEGURANÇA ALIMENTAR

A segurança alimentar, definida pelo Codex Alimentarius, visa garantir que os alimentos não apresentem perigo para o consumidor quando são preparados e/ ou consumidos de acordo com o papel para o qual foram destinados (CDC, 2010).

Conforme os dados do Ministério da saúde (2010), inúmeros países da América Latina estão aprimorando seus sistemas nacionais de vigilância epidemiológica das doenças alimentares, visando expandir os conhecimentos sobre os agentes etiológicos, a forma de contaminação e a mínima concentração necessária a ser ingerida para caracterizá-lo impróprio ao consumo.

Estas medidas vêm sendo estimuladas por recomendações e acordos internacionais, dos quais representantes do Brasil têm participado, como na 16ª Reunião Interamericana a nível Ministerial, em Saúde e Agricultura (RIMSA 16, 2012) onde reconheceram o papel da inocuidade dos alimentos na erradicação da fome e desnutrição e prevenção de resistência aos antimicrobianos e doenças alimentares. Destacou-se a necessidade de controles reguladores para garantir a inocuidade dos medicamentos de uso veterinário e rações para animais com intuito de garantir a segurança dos produtos de origem animal. Alertaram ainda que os países deveriam adotar padrões altos e comuns de inocuidade dos alimentos para proteger os consumidores no mercado global.

Estes esforços são considerados fundamentais para acompanhar a mudança do perfil da população com relação aos seus hábitos alimentares aliados à diversidade de alimentos oferecidos aos consumidores com tecnologias distintas, muitas vezes questionáveis, como é o caso das Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) destinadas aos neonatos. Neste produto a etapa da esterilização não é contemplada durante sua fabricação, fato que tem gerado uma crescente preocupação para os órgãos de vigilância sanitária em decorrência de casos fatais envolvendo essa matriz alimentícia. Portanto, empenhos para garantir alimentos inócuos aos consumidores,

principalmente àqueles que necessitam cuidados especiais, são de extrema necessida, considerando que, no caso das FID em que obrigatoriamente têm que ser hidratado para o consumo, o aumento da umidade (consequentemente da atividade de água) pode proporcionar a multiplicação do patógeno.

A atividade de água destaca-se no queijo Minas Frescal, considerado um queijo de alta a muito alta umidade (46-55%), semi-gordo e fresco, sendo por estes motivos bastante vulnerável a contaminação por diversos microrganismos, portanto o controle higiênico sanitário se faz necessário tanto na indústria para evitar perdas econômicas como para a saúde coletiva pelo risco potencial em causar doenças alimentares (FEITOSA et al., 2003).

Além destes fatores, na Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004) alertou sobre o risco da pressão seletiva de bactérias resistentes nos alimentos de origem animal, como o leite e derivados, pela utilização incorreta destes medicamentos na produção animal e no tratamento de doenças dos animais e dos humanos. A maioria dos antimicrobianos está sendo ineficiente para o combate destes microrganismo e, segundo dados do Ministério da Saúde (MS, 2012), há provas conclusivas, de que o mau uso de antimicrobianos é o principal responsável pela seleção de resistência e o custo para as indústrias farmacêuticas desenvolverem fórmulas de medicamentos mais potentes é elevado, podendo levar anos até serem aprovados e comercializados, contudo não existe a garantia do sucesso terapêutico.

3.2 DOENÇAS ALIMENTARES

Segundo o “Centers of Disease Control and Prevention”(CDC,2010) casos frequentes de doenças alimentares são originados por novos agentes etiológicos, aliados ao uso indiscriminado de antimicrobianos, seja na criação e manejo de animais, ou pela própria população. Representam aspectos de grande preocupação mundial com relação à possível transferência de resistência aos antimicrobianos para os humanos.

Nos Estados Unidos, a cada ano, 48 milhões de enfermidades são veiculadas por agentes etiológicos de doenças alimentares, destas, apenas 9,4 milhões são causadas por agentes patogênicos conhecidos (CDC, 2010).

Recentemente, as doenças alimentares são abordadas em três grupos distintos: as Toxinoses, as Infecções e as Toxinfecções. No primeiro grupo os exemplos clássicos estudados são o *Staphylococcus aureus* e o *Bacillus cereus* emético*,* produtores de toxinas pré-formadas no alimento. No segundo grupo a *Salmonella* spp. *e a E. coli.* Estes são microrganismos que, ao serem ingeridos com o alimento, se multiplicam no Trato Gastro Intestinal (TGI), produzindo toxinas e danos ao sistema digestivo, pois ocorre a invasão e colonização do epitélio. Finalmente o terceiro grupo são das bactérias que, ao serem ingeridas com o alimento, liberam toxinas no TGI quando esporulam, porém neste caso não há colonização (FRANCO, 2012).

Os agentes etiológicos das doenças alimentares são classificados como clássicos cujos dados clínicos e epidemiológicos são conhecidos; os emergentes ditos como “novos agentes” causadores de doenças alimentares, um exemplar é a *Cronobacter* spp.; e os reemergentes, caracterizando a reincidência dos agentes clássicos, algumas vezes em episódios mais graves do que a primeira passagem (FRANCO, 2012

3.3 MICRORGANISMOS INDICADORES DA QUALIDADE E INOCUIDADE DOS ALIMENTOS

Silva et. al (1995), alegaram que os microrganismos potencialmente patogênicos podem causar surtos de toxinfecções alimentares quando estiverem em altas concentrações no alimento como ocorre com o *S. aureus*, a *Salmonella* spp, o *Bacillus cereus*, os coliformes fecais entre outros. Entretanto estes mesmos microrganismos quando presentes em pequenas concentrações não oferecem riscos à saúde, sendo considerados indicadores das condições higiênico-sanitárias do processo de fabricação. Concluindo-se que os procedimentos de manipulação

higienização, ou até mesmo os processos tecnológicos relacionados com o binômio tempo-temperatura devem ser revistos para se ter um alimento de qualidade.

Segundo o mesmo autor, as análises microbiológicas são ferramentas que devem ser utilizadas para avaliar riscos iminentes como os surtos de Doenças alimentares e sugere que quando os microrganismos potencialmente patogênicos atingirem contagens superiores à 10^5 UFC/g de alimento, ou quando existirem alterações sensoriais importantes que impessam seu consumo, estar-se-á diante de um problema de origem alimentar.

Especialistas da FAO/OMS (2004), em seus estudos sobre a inocuidade microbiológica de fórmulas infantis para lactantes, identificaram três categorias de microrganismos envolvidos com o alimento em questão e as enfermidades observadas nos pequenos pacientes:

a) Microrganismos, cuja presença no alimento foi considerada prova substancial de causalidade para a enfermidade observada nos pacientes, ou seja, a presença destas bactérias no alimento foi diretamente relacionada com a causa da doença, ocorrência observada com a *Salmonella* entérica e a *Cronobacter* spp.
b) Microrganismos que foram isolados no alimento, passíveis de terem causado a doença, porém sem claras evidências de que o alimento em questão foi a fonte de contaminação e desencadeador da enfermidade como outras enterobactérias por exemplo.
c) Microrganismos, cuja causalidade é mais rara, ou pouco identificada e estudada em fórmulas infantis como *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Clostridium botulinum, C. difficile, C. perfringens, Listeria monocytogene.*

Na avaliação deste risco, considerar-se-ão os indicadores da qualidade higiênico–sanitária dos produtos lácteos. Para as Fórmulas Infantis, os coliformes (à 35℃ e à 45℃), o *Staphylococcus* coagulase positiva, *B. cereus* e *Salmonella* spp., para o queijo Minas frescal os coliformes (à 45℃), o *Staphylococcus* coagulase positiva e a *Salmonella* spp., seguindo a legislação brasileira (RDC N°12). Além

destes, foi pesquisada a *Cronobacter* spp. que, apesar de não estar inserida nas normas do Brasil, fato que pode estar relacionado a um microrganismo emergente, vem revelando-se uma bactéria potencialmente patógena nas fórmulas infantis apesar de inúmeros pesquisadores de outros países já isolaram-na de diversas matrizes alimentícias de origem animal ou não.

3.4 PRODUTOS LÁCTEOS

3.4.1 **Fórmulas infantis**

Muitas campanhas e orientações sobre a importância do aleitamento materno são realizadas para incentivar a utilização do leite humano até os seis meses de idade dos recém-nascidos.

Entretanto, em alguns casos, existe a necessidade de suplementação desta nutrição por meio de Fórmulas Infantis Desidratadas (FID), cuja composição é adequada à alimentação, porém são intensamente manipuladas durante o processo tecnológico de produção, o qual não inclui a etapa de esterilização (WHO/FDA/FAO, 2007).

Desta forma, inúmeros relatos têm associado às fórmulas lácteas infantis em pó como fonte e veículo de infecção por microrganismos resistentes a elevadas temperaturas e com grande potencial de multiplicação, particularmente no intervalo de tempo entre o preparo e o consumo da fórmula reconstituída, como é o caso da *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) (EL-SHAROUD, 2009; FARBER, 2004; IVERSEN, FORSYTHE, 2003).

Antes da fase de consumo, Rowlands et al. (2006) alertaram sobre a importância dos cuidados nas etapas de preparo e manipulação das fórmulas infantis, consideradas pontos críticos de controle.

Esper (2010) constatou a formação de biofilme por *Cronobacter* spp. e *B. cereus* em superfícies de aço inoxidável. Os resultados de sua pesquisa ressaltaram a importância das boas práticas de fabricação para evitar a contaminação das superfícies que entram em contato com o alimento durante a produção e/ou reconstituição das Fórmulas Infantis.

Em 2004 a Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização para Alimentação e Agricultura (FAO) advertiram que "Fórmula Infantil em pó não é estéril e pode conter bactérias que podem causar doenças graves em crianças, a preparação e manuseio correto reduz o risco de doenças.". Este alerta foi transmitido após estudos científicos sobre a presença de bactérias nocivas em Fórmula Infantil em pó. Concluíram que a presença de bactérias potencialmente letais como a *Salmonella* spp. e a *Cronobacter* spp. podem ser encontradas e multiplicarem-se a níveis patogênicos ao ser adicionada a água para o preparo deste alimento.

Portanto, a inocuidade das FID deve ser garantida por controles da qualidade dos processos durante sua fabricação, reconstituição, estocagem e consumo.

Para regulamentar este processo, na legislação brasileira, em consonância com as diretrizes internacionais da WHO/FDA (2007) referenciadas no “Codex Alimentarius”, foi direcionado este controle por legislações específicas que fornecem instruções para o preparo destas fórmulas. A principal orientação consiste na temperatura ideal para a reconstituição deste alimento, não devendo ser inferior a 70℃, esta é uma estratégia eficaz para a redução do risco em todos os cenários investigados.

3.4.1.1 Processamento industrial das fórmulas infantis em pó

O componente principal utilizado na preparação das fórmulas infantis em pó é o leite de vaca, por apresentar maior semelhança ao leite materno. No entanto, alguns componentes necessitam ajustes como as proteínas, minerais, vitaminas, gordura modifica e a relação Ca/P (NAZAROWEC-WHITE; FARBER, 1997).

Apesar de existirem inúmeras marcas e diversas combinações de ingredientes e aditivos para compor as FID, os processos de fabricação utilizados pelas empresas são semelhantes.

Em conformidade com a FAO/WHO (2004), estes produtos podem ser obtidos por três processos:

• Processo úmido: onde os ingredientes são misturados na fase líquida, posteriormente são submetidos à pasteurização e desidratação;

• Processo seco: quando os ingredientes são preparados individualmente, tratados termicamente, desidratados e então misturados (todos em fase seca);
• Processo combinado: quando parte dos ingredientes é processada usando o processo úmido, produzindo uma base na qual a outra porção dos ingredientes em fase seca é adicionada.

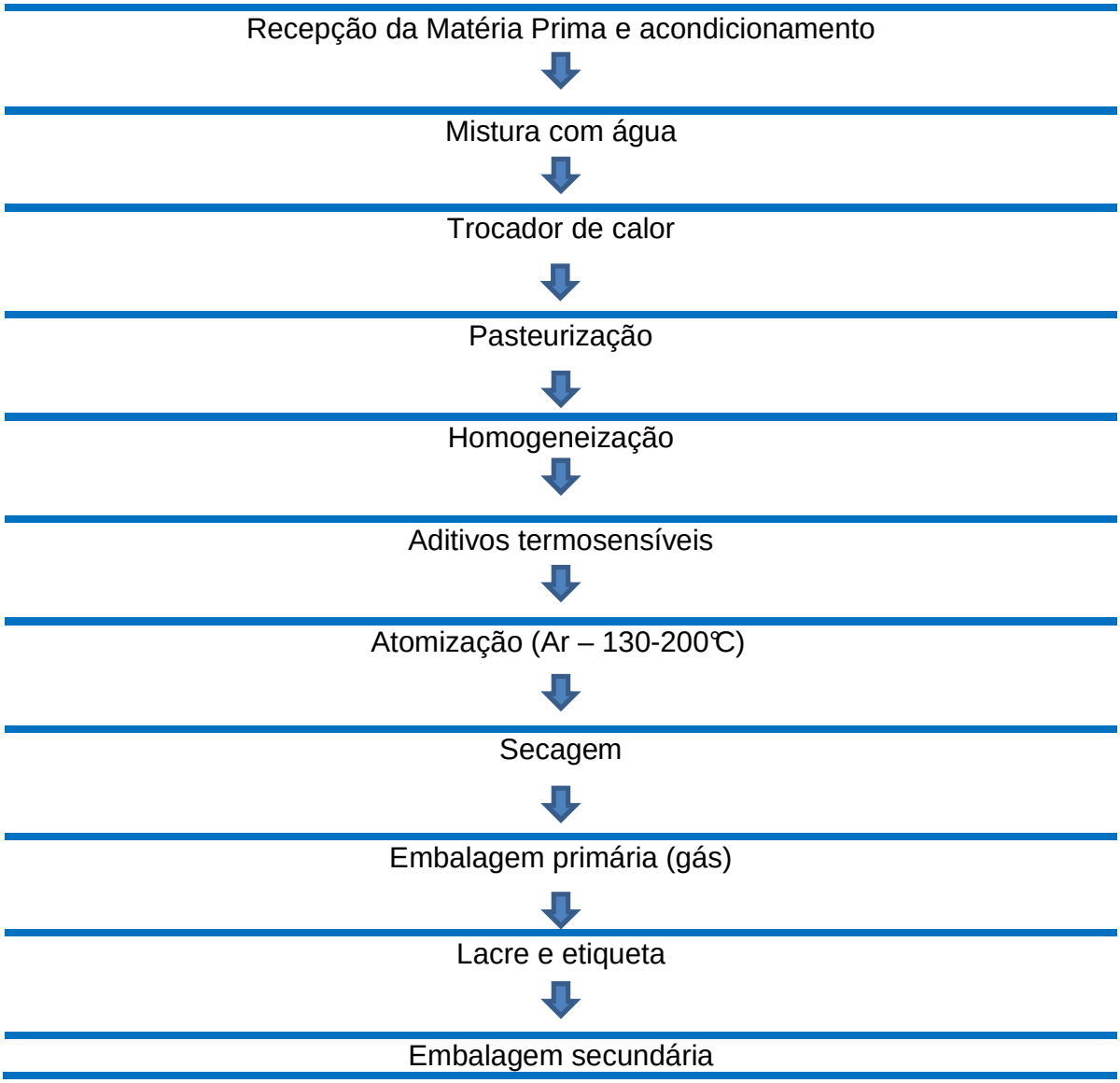
Um resumo dos processos tecnológicos, seco combinado e úmido (Figura 1), utilizados para a fabricação das Fórmulas Infantis em pó foi descrito por Zink (2003). Este autor informou que, tanto o processo seco como o processo combinado, oferecem algumas vantagens econômicas quando comparados com o processo úmido, pois necessitam menor investimento financeiro e utilizam melhor a energia. O processo seco apresenta ainda a vantagem tecnológica de não utilizar água no fabrico, desta forma a linha de processamento pode ser mantida seca por longos períodos de tempo, desfavorecendo o desenvolvimento de microrganismos em algarismos suficientes para causar a contaminação dos produtos. Neste caso, o risco que deve ser eliminado está relacionado com a qualidade microbiológica dos ingredientes constituintes, uma vez que, nesta metodologia não existe qualquer tratamento térmico com poder letal sobre as bactérias potencialmente patológicas. Evidenciando que, se um ou mais ingredientes adicionados na fase seca estiverem contaminados, mesmo que em quantidades ínfimas, poderão estar presentes no produto acabado. Resumidamente, o processamento por via seca compreende a recepção e acondicionamento dos ingredientes para posterior avaliação da sua conformidade com as especificações estabelecidas como a qualidade microbiológica. Para isso, os fornecedores devem cumprir os requisitos de qualidade e segurança dos seus produtos, sendo esta uma exigência que deve ser executada pelos fabricantes das FID, visando garantir segurança do produto final. A próxima fase é a mistura dos ingredientes até completa homogeneização, então segue-se o processo de peneiramento através de um tamisador, removendo as partículas de tamanho superior e todo o material estranho que por ventura possa existir, finalmente, esta mistura é transferida para suas embalagens primárias, geralmente o espaço vazio é preenchido

por gás inerte lacradas, etiquetadas, embaladas e acondicionadas em embalagens secundárias como as caixas de papelão.

O processo úmido descrito por Zink (2003) segue as etapas acima descritas para recebimento e acondicionamento da matéria prima. Neste processo tem-se um aliado tecnológico relacionado com a qualidade do produto final que é a pasteurização por eliminar as bactérias patogénicas que possam estar presentes nos ingredientes. É um processo mais oneroso, dependente da aquisição de equipamento de transformação, requer maiores cuidados com a limpeza, utiliza água que é um componente especial para o desenvolvimento e instalação de bactérias no ambiente da produção. Os ingredientes são misturados com água em grandes lotes e posteriormente bombeados para um trocador de calor para a pasteurização e homogeneização. Nesta fase, os componentes sensíveis ao tratamento térmico (vitaminas, aminoácidos e ácidos graxos) são adicionados ao produto. Estes componentes devem ter qualidade microbiológica comprovada, pois não será realizado outro processo térmico que assegure a destruição das bactérias nocivas.

A próxima etapa consiste na atomização do produto, utilizando-se o ar aquecido e filtrado por filtros “High Efficiency Particulate Air” (HEPA), cuja temperatura pode variar 130ºC a 200ºC, conforme o processo e o equipamento utilizado. A mistura é aspergida na câmara de secagem, a água evapora em contato com o ar superaquecido, produzindo o pó que se deposita por gravidade na parte inferior do atomizador. Ao final deste processo a temperatura do produto pode variar entre 40 e 80ºC, após é resfriado com ar igualmente filtrado para minimizar o risco de contaminação até atingir 20℃ aproximadamente, segu indo para a linha de embalagem.

FIGURA 1 : Processamento industrial das fórmulas infantis em pó - Processo úmido



Adaptado de: Zink (2003).

Nos princípios gerais de higiene alimentar estabelecidos no código de práticas internacionais (CAC/RCP 1-1969), são considerados que as instalações e equipamentos da indústria produtora de fórmulas infantis devem ser projetados e construídos com o propósito de evitar a contaminação por *Salmonella* spp. e *Cronocbacter* spp. Determinam que se reduza ao mínimo o estabelecimento ou multiplicação nos lugares de agregação. Além da separação adequada entre as áreas úmidas e secas, o controle da movimentação dos funcionários, dos equipamentos e produtos. Alertam que a quantidade de água, mesmo que em mínimas quantidades, em pontos de condensação favorece a proliferação da *Cronobacter* spp. que, assim como a *Salmonella* spp., é altamente resistente a ambientes secos por longos períodos de tempo. Os cuidados devem ser apurados com relação ao fluxo de produção à limpeza e vigilância ambiental em especial nas áreas de extremo controle de umidade e higiene. Foram propostas medidas com a finalidade de evitar a contaminação do produto seco durante sua manipulação depois das fases de tratamento térmico (CAC/RCP 1-1969).

3.4.2 **Queijo Minas Frescal**

Conforme Regulamento Técnico Mercosul de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal (BRASIL, 1997) o queijo fresco é um alimento pronto para o consumo, logo após a fabricação, sendo o queijo Minas Frescal obtido por coagulação enzimática do leite com o coalho e/ou enzimas coagulantes apropriadas, podendo ser complementada com a ação de bactérias lácteas específicas.

Outra classificação é definida pela Anvisa (BRASIL, 2001), que leva em consideração o teor de umidade do queijo, portanto pode ser definido como: de alta umidade (46%); de muita alta umidade (55%) com bactérias lácticas abundantes e viáveis, ou de muita alta umidade (55%) sem a ação de bactérias lácteas, elaborados por coagulação enzimática.

Os queijos em geral são intensamente manipulados durante o processo de fabricação, portanto considerados veículos potenciais no carreamento de agentes patogênicos, principalmente os fabricados com leite cru, os frescais, que não são

maturados, podendo ser protagonistas de um grande prejuízo econômico e social pelo risco de causar surtos de doenças de origem alimentar (FEITOSA et al., 2003).

Deste modo, colocar em prática os conceitos de qualidade produtiva, como as boas práticas de fabricação e os autocontroles na indústria alimentícia, torna-se decisivo para a garantia de um alimento seguro (PICOLI et al., 2006).

3.4.2.1 Processamento industrial do queijo Minas Frescal (Figura 2)

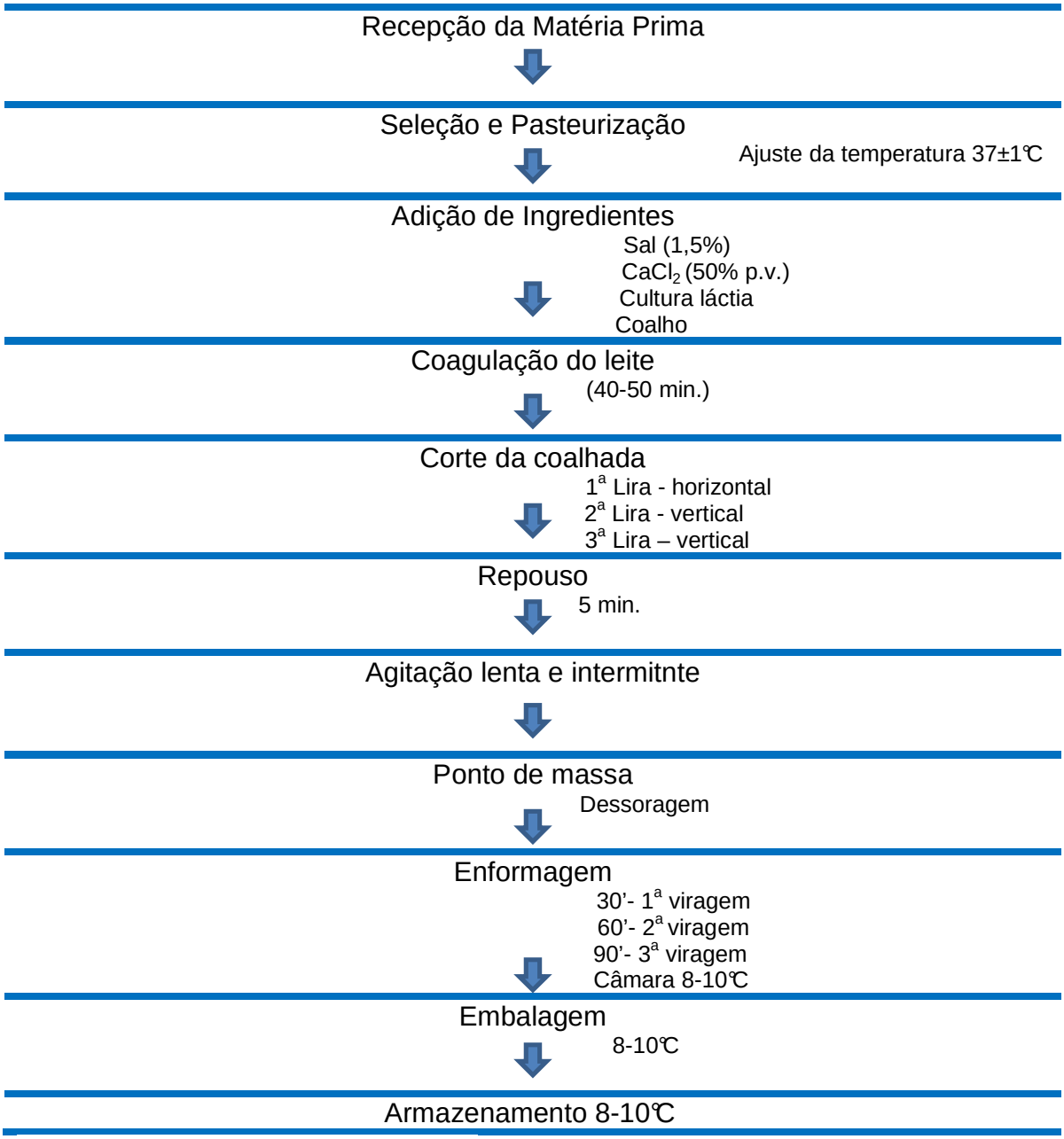
O processo básico de fabricação dos queijos é comum a grande maioria, compreendendo as etapas de recepção da matéria-prima, seleção e pasteurização, coagulação do leite, corte da coalhada e consequente liberação do lactosoro, enformagem, salga e embalagem (SPREER, 1991).

Após a pasteurização, o leite é bombeado para um tanque de dupla camisa de aço inox, neste é submetido a aquecimento até atingir 37±1℃, adicionando-se o fermento lácteo, o cloreto de cálcio, o coalho e o sal. O leite então fica em repouso por aproximadamente 40-50 minutos, sendo cortado com o uso de liras após esse tempo.

A agitação ou mexedura, comumente conhecida, é realizada desde o momento do corte até que a massa alcance o ponto desejado, isso leva em média 20 minutos, com intervalos onde a massa é mexida aproximadamente por cinco minutos, posteriormente por cerca de três minutos de descanso. Após atingir o ponto, a massa é retirada do tanque com o uso de peneiras e colocada em formas plásticas, sendo efetuadas posteriormente, três viragens; após 30, 60 e 90 minutos em câmara fria (8-10℃). O queijo, então, é embalado em sacos plástic os (Figura 3) acondicionado em caixas plásticas e colocado em câmara frigorífica com temperatura inferior a 5℃ até o momento de sua distribuição que é feita em caminhões com carroceria isotérmica.

É retirada uma amostra de cada lote para a realização de análises físico químicas (pH, EST e teor de gordura) e microbiológicas (contagem de BHAM , contagem de coliformes total, fecal e fungos).

Figura 2: Processo Industrial do Queijo Minas Frescal



Adaptado de: Furtado e Lorenço (1994)

Fig.3: Queijo Minas Frescal em recipientes de plástico prontas para a viragem e em embalagem primária. Estágio supervisionado Junho de 2007.

Os diferentes tipos de queijo surgiram da qualidade do leite, das técnicas de processamento e do tempo de maturação (PERRY, 2004). Portanto existe em diversas etapas da produção de queijos a possibilidade de contaminação. Assim sendo, a qualidade do produto final está diretamente relacionada com as condições higiênico-sanitárias desde o recebimento da matéria prima, passando pelo processamento industrial, pelas condições de sanificação do ambiente, qualidade da água, até chegar ao armazenamento e transporte (ICMSF, 1997).

3.5 CARACTERÍSTICAS DOS MICRORGANISMOS

3.5.1 ***Escherichia coli***

A *Escherichia coli* pertence à família Enterobacteriaceae, são bacilos Gram (-), não esporulados, fermentam a lactose e glicose com produção de ácido e gás. Possuem antígenos somáticos O (polissacarídeos da membrana externa), antígenos flagelares H (proteínas de flagelos), e antígenos K (polissacarídeos capsulares). Pode ser diferenciada das variedades não patogênicas através da Imunologia e métodos Incluindo a sorotipagem que é essencial para os estudos epidemiológicos (FRANCO, 2002; TRABULSI ;TOLEDO, 1989_a).

A espécie compreende grupos e tipos sorológicos, identificados por meio de anti-soros preparados contra as três variedades de antígenos da espécie (antígenos O, K e H), entretanto, nem todas as amostras apresentam os três tipos ao mesmo tempo afirmaram Trabulsi e Alterthum (2008) que ainda caracterizaram as cepas de *E.coli*, consideradas patogênicas, em cinco classes: EPEC *(E. coli* enteropatogênica clássica), EIEC (E. *coli* enteroinvasora), ETEC (E. *coli* enterotoxigênica), EHEC (E. *coli* Enterohemorrágica) e EaggEC *(E.coli* enteroagregetiva). Afirmaram ainda que as bactérias das classes EPEC, EIEC, ETEC e EHEC, raramente causam infecções extra-intestinais, que são causadas por amostras de *E. coli* dos sorogrupos que participam da microbiota normal dos intestinos, podendo se localizar em qualquer órgão ou tecido. Relataram que as infecções mais frequentes são: infecções urinárias ascendentes, meningite do recém-nascido, originando casos de bacteremia.

A presença de *E. coli,* além de tornar o alimento impróprio ao consumo, as estirpes enteropatogênicas (EPEC) caracterizam risco elevado aos consumidores, por ocasionarem diarreia severa e prolongada, levando à desidratação e morte, com relatos entre 25 a 50% de mortalidade nos países em desenvolvimento (FDA, 2012).

Silva (1988) expôs que os surtos de EPEC são esporádicos, porém mais incidentes em países que possuam práticas sanitárias deficientes. Afirma ainda que esta estirpe enteropatogênica causa a destruição das microvilosidades intestinais a partir da aderência da bactéria à membrana plasmática do enterócito, ocasionando diarréia com febre, náuseas e vômitos

Em 2005 Trabulsi informou que a *E. coli* enteropatogênica, era um dos principais microrganismos responsáveis por quadros de diarréia em crianças e que os sorogrupo O111 e O119, eram os mais relacionados aos surtos.

Franco e Landgraf (2001) descreveram que os sintomas mais comuns observados pela ação das estirpes patogênicas da *E.coli* são as diarreias mucóides acompanhas ou não de sangue nas fezes.

Estas cepas patogênicas possuem mecanismos que as permitem formar biofilme. Alguns autores sugerem a produção de flagelo como sendo um dos

mecanismos, pois aproxima a bactéria das superfícies como ocorre com a *Pseudomonas aeruginosa* e com a *E. coli* (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

A presença de *E. coli* no alimento caracteriza a contaminação direta ou indireta de origem fecal, indicam condições higiênicas insatisfatórias e representam um risco microbiológico, pois diversas estirpes são comprovadamente patogênicas aos humanos e aos animais (FRANCO; LANDGRAF 2001).

3.5.2 ***Staphylococcus*** **coagulase positiva**

O *Staphylococcus* spp. é um patógeno considerado clássico para muitos autores sob o ponto de vista epidemiológico e clínico, envolvido em diversos surtos relacionados com as doenças alimentares, foram descritas 49 espécies deste microrganismo e 26 subespécies (EUZÉBY, algumas destas espécies apresentaram a característica de produzir a enzima extracelular denominada coagulase, e assim nomeadas como coagulase positiva para as espécies que coagulam o plasma de coelho, dentre as quais o *S. aureus*. Esta prova pode apresentar ainda o resultado negativo, caracterizada pela ausência da enzima para as demais espécies de *Staphylococcus* denominados não *aureus.* É o agente etiológico mais conhecido como causador de intoxicações alimentares, seguido pelo *S. intermedius* e pelo *S. hyicus* (JAY, 1992; KONEMAM et al., 2001).

São cocos G+, anaeróbios facultativos, pertencente à família *Micrococcoceae*, podendo ser diferenciados entre outros microrganismos também G+ e anaeróbios facultativos, por apresentar resultado positivo à prova da catalase. São mesófilos, podendo crescer em temperaturas entre 7℃ a 47,8℃ (FRANCO; LANDGRAF, 2002). Estes autores apontaram a tolerância a concentrações de 10 a 20 % de NaCl e a nitratos, admitindo valores baixos de Aa para seu crescimento (0,86-0,83), porém nestas condições não produzem enterotoxinas.

Reconhecido pelos serviços de saúde de muitos países como causador de doenças toxinogênicas. O *S. aureus* produz toxinas chamadas de enterotoxinas. destacando-se as do tipo A,B,C,D,E,F, pré-formadas no alimento e, quando ingeridas, são potencialmente tóxicas para o ser humano. Seus efeitos deletérios estão

diretamente relacionados com o sítio biológico de atuação da toxina liberada e o mais importante, é que são termoestáveis, podendo ser veiculadas também por alimento cozido, acarretando a peculiar intoxicação alimentar (SILVA Jr., 1995), cujos sintomas incluem náuseas, vômitos, raras diarréias, sem febre, podendo aparecer num curto período de tempo, geralmente entre uma a seis horas desde a contaminação e entre os principais alimentos envolvidos nos surtos alimentares estão o leite e o queijo entre outros.

Acha (1986) afirmou que os seres humanos são a principal fonte de contaminação por este agente, por ser comumente isolado em diversas regiões do corpo humano, como nas secreções nasais, orofaringe, pele. Ressaltou que um fato que merece atenção é a revelação de cepas resistentes aos antimicrobianos nos animais em cuja alimentação se incluía antimicrobianos. Cita ainda que o motivo da preocupação é a possibilidade das cepas resistentes deste microrganismo ser transmitidas aos seres humanos. Diversos autores revelaram que os manipuladores de alimentos são as principais fontes de contaminação (ANDRADE, 2003; ANDRADE 2008, SILVA, Jr, 2007) por possuírem hábitos de higiene inadequados que irão influenciar diretamente na qualidade do produto final.

3.5.3 ***Bacillus cereus***

São bacilos Gram-positivos anaeróbios facultativos e que formam esporos. Por este motivo a cocção e o reaquecimento dos alimentos não os destroem (FRANCO; LANDGRAF, 2001; JAY,1992).

Silva (1995) considerou que sua importância clínica está no fato de causarem intoxicações alimentares e que os alimentos incriminados nos surtos são o arroz cozido ou frito, feijão cozido, pudim contendo amido de milho ou baunilha, arroz doce, canjica, entre outros. Descreveu o quadro clínico causado pelos dois tipos de *B. cereus,* o emético e o diarreico (clássico). O primeiro produz enterotoxina termoestável, causando uma toxinose alimentar com período de incubação de aproximadamente seis horas segundo, causa infecções intestinais acompanhadas

por diarréias e vômitos e incubação variando entre oito a 22 horas. Não ocorrendo febre em ambos os casos. Afirmou também que as duas formas deste microrganismo são destruídas com o tratamento térmico a 100℃ dur ante cinco minutos, porém a cocção e o reaquecimento dos alimentos não são eficientes contra os esporos, possuem ainda a capacidade de multiplicação numa ampla faixa de temperatura, variando entre 5℃ a 50℃.

Forsythe (2013) informou que o alimento deixado por longos períodos em temperaturas inadequadas são alvos para a multiplicação deste microrganismo até níveis potencialmente patogênico (> 10^5 UFC/g), mesmo estando inicialmente em baixas concentrações no alimento. Fato que pode ocorrer facilmente, pois está amplamente distribuído pelo meio ambiente. Portanto, ressaltou que a principal forma para controle é a prevenção da germinação e a multiplicação dos esporos em alimentos cozidos e prontos para o consumo e a estocagem dos alimentos em temperaturas inferiores a 10℃ para inibição da mul tiplicação do *B. cereus.*

Furtado et al. (2013) relataram os resultados da pesquisa realizada pelo Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do Instituto Nacional de Saúde (INSA) em Lisboa entre 2007 e 2011, informando que foram encontradas estirpes de *Bacillus cereus* em 27% das amostras em conformidade com a legislação e destas 16% eram produtoras de toxinas. Concluíram que a presença desta bactéria pode constituir um risco potencial se a preparação do alimento for realizada com muita antecedência e a manutenção em temperaturas favoráveis ao desenvolvimento deste microrganismo em concentrações que permitam a produção de toxinas.

A prevalência *de B. cereus* foi pesquisada em produtos lácteos em pó, os quais eram distribuídos em escolas no Chile. Foram realizadas análises em 381 amostras do produto e concluíram que 45.9% estava contaminada com este microrganismo, representando um risco para os consumidores. (REYES et al., 2007)

3.5.4 ***Salmonella* spp.**

Assim como *a E. coli* e a *Cronobacter* spp, a *Salmonella* spp. pertence à família das Enterobacteriaceae, são bastonetes curtos Gram-negativas, anaeróbias

facultativas e não formam esporos, são termosensíveis, portanto podem ser destruídas com aquecimento numa temperatura variando entre 60℃ a 66℃ por um minuto (ICMSF, 1996; SILVA, 1995)

Entre as várias espécies desta bactéria, a S. *Typhi* e a S. *enteritidis* e seus sorotipos paratíficos, *Paratyphi* A e *Paratyphi* C são os mais específicos para o ser humano. Excetuando-se estas espécies todas as outras infecções causadas por *Salmonella* podem ser consideradas zoonoses (ACHA, 1986). Segundo este autor sua ocorrência é muito comum tanto em humanos como em animais. A de origem animal pode causar nos humanos infecção intestinal, cujos sintomas como febre, náuseas, vômitos e diarreia aparecem entre seis a 72 horas após ingestão do alimento contaminado. No entanto é uma doença auto-limitante e a recuperação geralmente ocorre entre dois a quatro dias. Ressaltou que os indivíduos acometidos por esta infecção podem permanecer portadores e eliminadores deste microrganismos por algumas semanas ou mais, dependendo da espécie causadora, as *S. Typhi* e os sorotipos paratíficos originam portadores persistentes.

Forsythe (2002) admitiu que a contaminação dos alimentos ocorre devido a falhas no controle da temperatura, das práticas de manipulação, além da contaminação cruzada entre alimentos crus com os já processados Dentre os alimentos envolvidos está o leite cru (SILVA, 1995), leite e derivados (ACHA, 1986; ANDRADE, 2008) que são o foco deste trabalho.

Segundo Andrade (2008) a dose infectante para esta bactéria pode variar entre 20 a 10^6 células conforme a idade e saúde do paciente.

Entre 2011 e 2012, conforme dados do “International Baby Food Action Network” (IBFAN), foram confirmados dezesseis casos de salmonelose na Rússia pelo consumo de Fórmula infantil em pó fabricada por uma empresa belga. Das vítimas, treze eram crianças entre dois a sete meses, uma criança de quatro anos e dois adultos.

Em um estudo realizado entre 1993 e 2000 na Espanha, descobriu-se que em humanos os sorotipos de *Salmonella* que adquirem resistência com maior rapidez são o *S.* Typhimurium e o *S.* Enteritidis (GILT-SETAS, 2002). Em diferentes regiões do

mundo a resistência da *Salmonella* aos antimicrobianos está associada à utilização indevida destes medicamentos para o tratamento das doenças em humanos e esta resistência vem aumentando nos últimos trinta anos com a utilização dos antimicrobianos nas produções pecuárias (WHO, 2004).

3.5.5 ***Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*)**

Até 1980 *a Enterobacter sakazakii* da família Enterobacteriaceae era conhecida pelo estudo taxonômico como uma espécie variante da *Enterobacter cloacae* produtora de pigmento amarelo, então surgiu a proposta de uma nova espécie, a *E. sakazakii* do gênero Enterobacter, com bases em tecnologias genéticas proposta por Farmer et al. (1980). Além da *E. sakazakii* outras bactérias da mesma família podem formar colônias com pigmento amarelo, entretando, poucas são capazes de produzir a enzima α-glucosidase entre elas a *E. sakazakii*. Outras características diferenciais foram sendo observadas através de testes sorológicos e morfológicos, nas respostas bioquícas e nas características genéticas até que em 2007 Iversen et al. elucidaram a taxonomia da *E. sakazakii* e propuseram uma reclassificação deste microrganismo, baseando-se em estudos relacionando as características genotípicas e fenotípicas de 210 estirpes identificadas como *E. sakazakii*, sugeriram um novo gênero o *Cronobacter* e as novas espécies *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter muytjensii, Cronobacter dublinensis* e *Cronobacter turicensis*, contudo reconhecem que as características taxonômicas destas bactérias ainda não estão totalmente esclarecidas e recomendam que sejam mantidas as mesmas metodologias utilizadas para o isolamento da *E. sakazakii* para este novo gênero.

A *Cronobacter sakazakii* é uma bactéria da família Enterobacteriaceae, classificada como um patógeno emergente, comumente encontrada em vários tipos de alimentos, sendo considerada uma bactéria oportunista. Do ponto de vista de saúde coletiva, não é um organismo amplamente investigado, ainda que sua presença seja relativamente comum em saladas, carne, leite e queijo (FAKRUDDIN et al., 2013). Mencionaram que os registros de infecções causadas por este organismo estão fortemente relacionados a recém-nascidos imunodeprimidos ou utilização de

fórmulas infantis em pó (PIF – do inglês *Powdered Infant Formula*), resultando em taxas de mortalidade relativamente elevadas (entre 40 a 80%).

Arsalan et al. (2013) reforçaram o caráter ubíquo desta bactéria, uma vez que sua presença pode ser verificada em ar, solo e ralos, além de ter sido isolada em diversos substratos tais como sangue, escarro, garganta, nariz, intestino, pele, ferimentos, olhos, orelhas, etc. Além disso, citaram também a facilidade que este organismo possui em aderir-se aos materiais como silicone, látex, policarbonato, metais como o aço inoxidável, entre outros. Em função destas características, e também por classificar este microrganismo como um dos contaminantes mais letais em alimentos pediátricos ou fórmulas de leite, destacaram a importância da adequada higienização dos materiais usados para alimentação e no preparo das FID a fim de reduzir o risco de formação de biofilmes que podem ser fontes de infecção.

Tendo em vista estas características e por sua virulência, capaz de produzir infecções graves como septicemia, enterocolite necrosante e meningite, estes autores reforçaram a recomendação das entidades reguladoras, tais como “Food And Drug Administration” (FDA), “Food and Agriculture Organization/World Health Organization” (FAO/WHO), “Center for Disease Control and Prevention and Health Canada” (CDC), aconselham a alimentação materna ao invés de via mamadeira, para evitar infecções por esta bactéria.

O comportamento microbiológico da *Cronobacter* spp. é de uma enterobactéria anaeróbia facultativa não esporulada, produtora de um pigmento amarelo. Apresenta-se sob a forma de bastonetes Gram-negativos móveis através de seus flagelos peritríquios. Com relação às características bioquímicas, apresenta catalase positiva e oxidase negativa (BRENNER et al., 2005).

O primeiro estudo relacionado à presença de *Cronobacter sakazakii* em Fórmulas Infantis com a infecção seguida de desenvolvimento de enterocolite necrosante foi relatado por Van Acker et al. (2001) que descreveram um caso de um surto de infecção por *Cronobacter sakazakii,* classificada na época por *Enterobacter sakazakii*, onde 12 crianças recém-nascidas em uma maternidade da Bélgica foram

infectadas, sendo que duas das quais foram à óbito. Este caso ficou conhecido como “Surto da Bélgica”.

Assunção em 2008 analisou 15 amostras de Fórmulas Infantis em pó disponíveis em Portugal empregando a norma ISO/TS 22964:2006, bem como a comparação da eficiência dos meios cromogênicos ESIA, DFI e ChromoCult. Não encontrando nenhuma das amostras contaminadas por *Cronobacter sakazakii*, porém, em todas foi identificada a presença de algum tipo de microrganismo, sendo que na maioria houve contagem de microrganismos aeróbios a 30ºC superiores a $1.0x10^1$ UFC/g, evidenciando que estes alimentos não possuem garantia de esterilidade.

Barreira, et al. (2003) descreveram o caso de um bebê de 14 dias acometido por meningite que ocasionou a morte do paciente, onde foi detectada a presença de *Enterobacter sakazakii* na cultura do líquor, mesmo a criança tendo sido alimentada exclusivamente por seio materno. Neste trabalho, não há indicação da fonte da contaminação.

Ainda assim, os casos de infeção causados por *Enterobacter sakazakii* declaradamente são baixos. Gurtler et al em 2005 relataram apenas 76 casos no mundo todo.

Entretanto, não se pode minimizar o problema em função de sua baixa taxa de ocorrência. Gillio (2006) citou haver um percentual considerável de subnotificações em função de que muitos laboratórios não estão preparados para adequada detecção deste microrganismo. Além disso, fez um grande apanhado de diversos casos de infecção causados por *Cronobacter sakazakii* ao longo do mundo, sendo diversos relacionados à ingestão de fórmulas e, com taxa de mortalidade muito elevada, entre 20 a 80% dependendo da fonte, em especial em crianças recém-nascidas, e com consequências bastante severas para os sobreviventes, incluindo sequelas neurológicas, como hidrocefalia, tetraplegia e retardo no desenvolvimento neurológico.

Na FAO e na OMS constam recomendações para que os países intensifiquem suas pesquisas sobre as fontes e veículos de infecção desse microrganismo, sobretudo nas Fórmulas Infantis em pó. Esta bactéria é capaz de permanecer viável

nas FID por ser altamente resistente às temperaturas, ao processo de fabricação deste alimento e causar danos à população mais susceptível que são as crianças com até um ano de idade, imunossuprimidos, prematuros e neonatos (SILVA et al., 2007).

A metodologia recomendada e publicada na “International Organization for Standardization” (ISO) é a ISO/TS 22964 (2006), que regulamenta os ensaios para a detecção da *Enterobacter sakazakii* em amostras de fórmulas infantis, leite em pó e ambientes relacionados à fabricação destes produtos. Baseados nesta metodologia, *a*lguns métodos para o isolamento vêm sendo desenvolvidos e aprimorados, devido à grande dificuldade de isolamento deste patógeno

Para o tratamento da doença a antibioticoterapia é indicada, porém de forma cuidadosa, tendo como base os dados da FAO e OMS sobre a preocupante resistência deste microrganismo aos fármacos comumente utilizados, sendo recomendado que a ecologia, virulência, reservatórios, fontes de infecção, assim com medidas para redução da prevalência em fórmulas lácteas infantis sejam investigadas, pois ainda carecem de informações e dados científicos que possam ser utilizados como ferramentas para o controle da enfermidade.

3.6 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

Estabelecer uma estratégia para conter a superação das bactérias frente aos antimicrobianos é de suma importância. Em contra partida, o uso impróprio de doses medicamentosas por períodos indeterminados e, acima de tudo, a utilização inconsciente do antimicrobiano, da funcionalidade e do espectro de utilização, poderá levar ao retrocesso da medicina moderna, com o retorno das altas taxas de morbidade e mortalidade por doenças infectocontagiosas.

Com suas recomendações, a Organização Mundial da Saúde (OMS) visa à tática de controle no Brasil, pela ANVISA, estabelecendo restrições ao fornecimento de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos - RDC nº 44, de 26 de outubro de 2010 (revogada pela RDC n˚17 e 20 de 2011), obrigando a retenção da receita médica nos estabelecimentos. Contudo, o mesmo não acontece com o comércio de produtos veterinários que são vendidos indiscriminadamente sem controle eficaz na fiscalização sob a competência do MAPA e que ainda não foi apresentada proposta eficiente para esta finalidade.

Nos dados da OMS há indicações de que uma em cada quatro mortes em todo o mundo são causadas por infecções e ocorrem principalmente nos países menos desenvolvidos. Ainda há alerta que 67% dos antimicrobianos designados ao uso terapêutico em seres humanos são usados sem prescrição médica e em 50% das prescrições utilizadas apresentam inadequações ao uso. Mundialmente, mais de 50% do orçamento com medicamentos são destinadas aos antimicrobianos. Em 2009 o país movimentou aproximadamente R$ 1,6 bilhão com o comércio de antimicrobianos, retratando aqui não só a importância econômica, mas também o controle deste produto amplamente utilizado e reconhecidamente importante para a saúde humana. (OMS, 2012).

Em pesquisa, Mantilla et al. (2008) mencionaram que a ingestão de alimentos contendo resíduos de fármacos antimicrobianos pode ocasionar resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados no tratamento de enfermidades infecciosas humanas. A prática da criação e o manejo dos animais de produção, utilizando

antimicrobianos para tratamentos inclusive nas rações colaborou para o aparecimento de microrganismos resistentes à antibioticoterapeutica. Fato que permite concluir que são de extrema importância as investigações do comportamento das bactérias frente aos antimicrobianos.

A finalidade de melhorar o controle e o uso dos antimicrobianos é minimizar a elevação da resistência bacteriana no país e no mundo, enfatizando o novo paradigma de “uma só saúde” (OIE, OMS, OPAS 2012) que se fundamenta no princípio de que o estado sanitário dos seres humanos está interligado com a saúde dos animais e ambos interferem no meio ambiente e este sobre todos, não tratando de uma nova ciência, ou trabalho, mas objetivando a colaboração intersetorial para prevenir, detectar e controlar as enfermidades dos humanos e dos animais, observando os parâmetros recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), representado pela Organização Pan-Americada de Saúde (OPAS) e pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE).

3.7 ASPECTOS REGULATÓRIOS

Utilizou-se a legislação brasileira vigente, RDC nº 12 de 02/01/01 – ANVISA (BRASIL, 2001), onde estão incluídos os padrões microbiológicos para alimentos como parâmetro para análise dos resultados encontrados sobre a pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva*, Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Salmonella* spp.

Para análise dos resultados de *Cronobacter* spp. em fórmulas infantis desidratadas, empregou-se a norma europeia (EC- N° 2073/2005) que entrou em vigor para a regulamentação das fórmulas infantis, pois a legislação brasileira não contempla a pesquisa de *Cronobacter* spp. nas FID. Nesta legislação especifica a *Cronobacter* spp. deve estar ausente em 30 amostras de 10 gramas de FID para bebês até seis meses de idade.

Outras legislações foram utilizadas como a RDC 43/2011 que é o Regulamento Técnico para Fórmulas Infantis (FI) a lactentes, onde consta que a FI possa ser um produto em forma líquida ou em pó, devendo ser utilizada sob prescrição, fabricada

para sanar as necessidades nutricionais de lactentes sadios durante os primeiros seis meses de vida, até cinco meses e 29 dias (ANVISA, 2011).

A RDC n. 44/2011 - Regulamento Técnico para Fórmulas Infantis (FI) de segmento para lactentes e crianças de primeira infância utilizada para crianças a partir de seis meses até um ano de idade incompleto (11meses e 29 dias) e para crianças de primeira infância sadias (12 até 36 meses de idade) como principal alimento líquido de uma dieta em construção (ANVISA, 2011).

A RDC n. 45/2011 - Regulamento Técnico para Fórmulas Infantis (FI) para lactentes, de segmento para lactentes e crianças de primeira infância que necessitam de dietas específicas (dietoterápicas) para atender as necessidades fisiológicas doenças temporárias ou permanentes, desenvolvidas para crianças até seis meses de idade (ANVISA, 2011).

NA Resolução. 42/2011 – Regulamento Técnico de compostos de nutrientes para alimentos destinados a lactentes e a crianças de primeira infância consta a determinação dos ingredientes que podem ser utilizados como nutrientes em alimentos para fins especiais destinados a lactentes e a crianças de primeira infância, compreendendo as fórmulas infantis (ANVISA, 2011).

A Resolução 46/2011 – Regulamento Técnico de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia para fórmulas infantis destinadas a lactentes e crianças de primeira infância, aplicado para FI para lactentes, de segmento para lactentes, crianças de primeira infância e com necessidades dietoterápicas (ANVISA, 2011).

Com relação ao comércio e suas relações com os alimentos para crianças, incluindo as fórmulas infantis, na Lei brasileira n° 11.265/2006 consta o regulamento da comercialização de alimentos para lactentes e crianças de primeira infância, além dos produtos de puericultura correlatos.

Determinações sobre rótulos foram encontradas nas Resoluções RDC n. 43, 44 e 45 de 2011, as quais preveem a declaração, no rótulo de fórmulas infantis, de instrução clara que o produto deve ser preparado com água fervida e posteriormente resfriada à temperatura não inferior a 70℃, para produtos que necessitam de reconstituição, decisão tomada com base nas diretrizes da FAO/WHO de 2006 e

2007, que são referenciadas no Código de Práticas de Higiene para Fórmulas Infantis em Pó para Lactentes e Crianças de Primeira Infância do Codex Alimentarius.

O CAC/RCP 66 (CODEX ALIMENTARIUS, 2008) é um documento com recomendações e instruções para o preparo e manuseio adequado de fórmulas infantis. No documento faz-se referência ao relatório do encontro de especialistas da FAO/WHO (2006) sobre *E. sakazakii* e *Salmonella* spp. em fórmulas infantis em pó, o qual apresenta inúmeras combinações de medidas para a redução significativa de risco e as diretrizes da WHO/FDA/FAO (2007) para a preparação, a manipulação e o armazenamento seguros de fórmulas infantis em pó. Reconhece que o uso de água a 70ºC para reconstituir fórmulas infantis reduz expressivamente o risco, que os casos de risco elevado associam-se às temperaturas de diluição entre 40℃ e 50℃ quando a fórmula não é consumida imediatamente após o preparo.

No relatório FAO/WHO (2006) foram tratados os aspectos relacionados à alta temperatura de preparo com a redução dos nutrientes termossensíveis, com o risco de queimaduras, com a ativação de esporos bacterianos, principalmente o *B. cereus* e com a formação de grumos. As informações são de que a vitamina C foi a única que teve redução expressiva, porém permaneceu com valores no intervalo estabelecido por norma disponível no Codex Alimentarius (CODEX STAN 72/1981, revisada em 2007). Com relação ao risco de queimaduras estabeleceu-se que devam existir alertas no rótulo para evitá-las, presentes nas resoluções brasileiras (RDC n. 43, 44 e 45, 2011). Sobre a possibilidade de ativação de esporos de *B. cereus*, em estudos realizados na Austrália em 2003, os pesquisadores revelaram que o nível de *B. cereus* nas fórmulas infantis não foi afetado pela temperatura da água usada de reconstituição das fórmulas (56℃ ou 90℃) ou pelas imediatas condições de resfriamento. Sobre a formação de grumos, concluíram que muitas fórmulas disponíveis não formam grumos quando reconstituídas a 70ºC, além disso, dispõe-se de diversas tecnologias que podem evitar este problema.

Outras recomendações (WHO/FDA/FAO, 2007) são realizadas para impedir a possibilidade de contaminação, para que as fórmulas não sejam mantidas em

temperaturas ambientes por período superior a duas horas desde a preparação, tendo em vista a contaminação no preparo.

Ainda sobre o aspecto legislativo, no Brasil, o preparo da nutrição enteral é conduzido pela resolução RDC nº 63 de 6 de julho, 2000, necessitando ainda de normas específicas para os lactários (BRASIL, 2000).

Um dos avanços na história do Brasil relacionado com a segurança alimentar e às práticas de higiene na indústria alimentícia e nos serviços de alimentação foi a publicação, pelo Ministério da Saúde, da portaria nº 1428 de 26/11/1993, recomendando a elaboração do Manual de Boas Práticas de Manipulação de Alimentos baseado em publicações técnicas da Sociedade Brasileira
de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA), Organização Mundial da Saúde (OMS) e “Codex Alimentarius”.

4 **MATERIAL E MÉTODOS**

4.1 MATERIAL

Todos os materiais permanentes utilizados nos experimentos pertenciam ao Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da UFF. Parte do material de consumo pertencia aos projetos de pesquisa do orientador e a outra parte foi adquirida pelo projeto FOPESQ.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 **Colheita de amostras e transporte**

Foram utilizadas 60 amostras, destas 30 eram de Fórmulas Infantis e 30 de queijo Minas Frescal (inspecionados pelo Serviço de Inspeção Federal – SIF), adquiridos no comércio do Município de Niterói/RJ, no período de novembro de 2012 a maio de 2013.

As amostras de queijo foram adquiridas aleatoriamente em embalagens primárias sob a forma íntegra ou fracionada, conforme a disponibilidade no comércio e transportadas em embalagem isotérmica até o Laboratório de Controle Microbiológico de Produto de Origem Animal, do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

As fórmulas Infantis foram colheitas nas embalagens primárias, tendo-se o cuidado de verificar a integridade física destas embalagens que pudesse revelar qualquer violação e, consequentemente, contaminação do produto, posteriormente foram transportadas ao mesmo laboratório.

4.2.2 **Identificação das amostras**

A identificação de cada uma das amostras foi realizada no momento da coleta com marcador permanente em etiquetas alocadas na embalagem primária, descrevendo os seguintes dados: dia, hora, local, assim como informações pertinentes referentes à amostra e condições da coleta.

4.2.3 **Preparo das subamostras para procedimento analítico**

No Laboratório de Controle Microbiológico dos Produtos de Origem Animal (LCMPOA), uma alíquota de 25g das amostras de Fórmulas Infantis desidratadas (FID) e de queijo Minas Frescal (MF) foi pesada em embalagens estéreis (Figura 4).

Em cada uma delas foram adicionados 225mL de solução salina peptonada (SSP) a 0,1%. Após a pesagem e adição da solução salina, homogeneizou-se durante dois minutos em equipamento “Stomacher”, obtendo-se desta forma a diluição 10^{-1}. A partir da referida concentração foram realizadas as demais diluições consecutivas 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4}, necessárias aos ensaios laboratoriais.

Fig. 4 : Pesagem e preparo das amostras de queijo MF e FID. LCMPOA/UFF/2013.

4.3 ANÁLISES

4.3.1 **Análises bacteriológicas**

4.3.1.1 Isolamento de coliformes totais e *Escherichia coli* (EC), e Sorologia.

O isolamento de coliformes totais e coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*) foi realizado pelo método cromogênico (Figura 6) descrito no “Standard Methods of the Examination of Water and Waste Water “(APHA, 1995). O meio de cultura utilizado para esta finalidade foi o “Rapid Hicoliform” (HIMEDIA M 1453), que possui uma combinação de substratos cromogênicos e fluorogênicos que reagem com a enzima B-D-glicuronidase específica da *Escherichia coli,* permitindo a revelação deste microrganismo.

Este meio de cultura é uma modificação do Caldo LMX descrito por Manafi e Kneifel. Utilizado para a detecção simultânea de coliformes totais e *Escherichia coli*, tornando seu método de identificação mais rápido do que os convencionais.

As diluições das amostras, descritas anteriormente, foram semeadas em três séries de três tubos contendo 10mL de Caldo “Rapid Hicoliform” (HIMEDIA M 1453) e incubadas a 36℃ ± 1℃/24-48h. Os tubos contendo soluções verde-azuladas, após incubação, indicaram positividade à presença de coliformes totais (Figura 5), a seguir foram colocados sob a luz ultravioleta de 366nm (Figura 6). O aparecimento da característica fluorescente da reação indicou a positividade desta prova. Nos tubos com material fluorescente (Figura 6), foi adicionado o Reativo de Kovac’s, a constatação do aparecimento de anel vermelho na superfície da solução indicou a presença de *E. coli.* pela formação do indol (Figura 7).

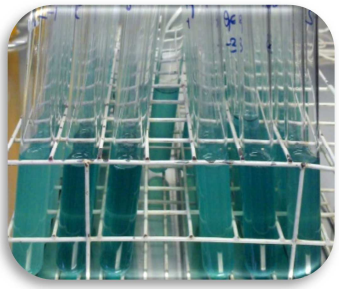


Fig. 5: Meio “Rapid Hicoliform”. LCMPOA/UFF/2013.

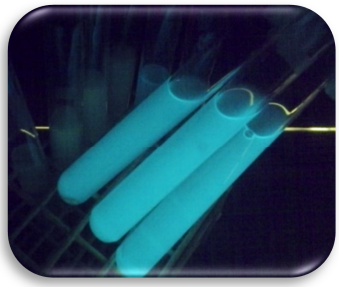


Fig. 6: Fluorescência : Indicativo de *E. coli.* LCMPOA/UFF/2013

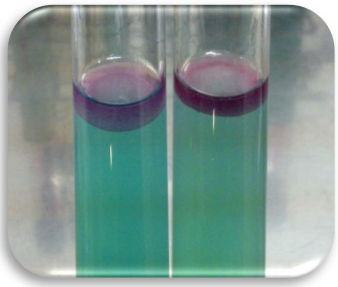


Fig. 7: Formação de Indol– *E. coli*LCMPOA/UFF/2013

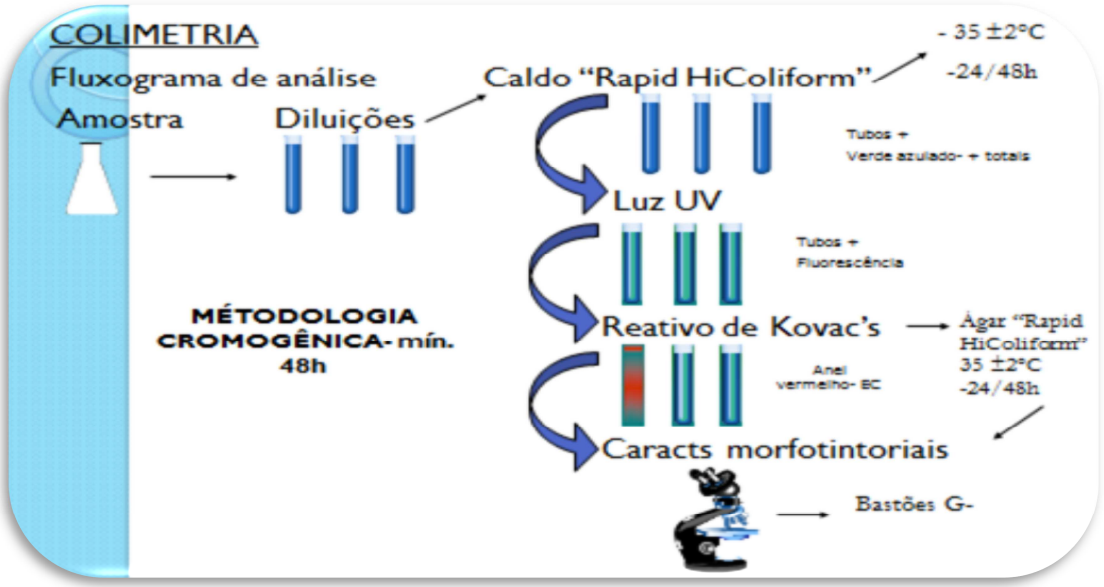


Fig. 8 - Esquema da Análise: Colimetria – Metodologia Cromogênica

Antes da adição do Reativo de Kovac's os tubos com fluorescência foram semeados em "Rapid Hicoliform" Agar para confirmação das características morfocoloniais da *E. Coli*. Para esta verificação foram confeccionados, a partir de colônias características, esfregaços corados pelo método de Gram, onde se observou a presença de bastonetes G-, característica deste microrganismo.

Após esta confirmação, os cultivos foram estocados para proceder a sorotipagem (Figura 9) e verificação de *E. coli,* pertencente aos grupos EPEC, EIEC, ETEC, EHEC e EaggEC.

A metodologia utilizada para a sorologia foi descrita por Ewing (1986). As colônias que aglutinaram (Figura 10) após o contato de até dois minutos entre os anticorpos polivalentes com os antissoros monovalentes correspondentes, determinaram o sorogrupo. A prova foi considerada negativa (Figura 11) para as culturas que não aglutinaram. Esta metodologia foi aplicada em todos os cultivos confirmados bioquimicamente como sendo *E. coli,* porém foram utilizados apenas antissoros polivalentes, pois não havia recurso financeiro suficiente para a compra dos soros monovalentes necessários para esta caracterização.

Neste caso foram utilizados os soros polivalentes da Probac do Brasil® para identificação de *E. coli* enteropatogênica clássica (Poli A, Poli B e Poli C), enteroinvasiva (Poli A e Poli B).

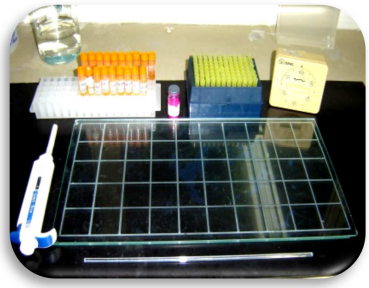


Fig. 9: Culturas, soros e placa para soroaglutinação - LCMPOA/UFF/2013.

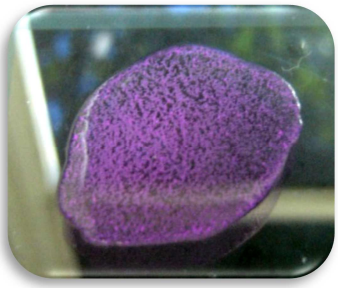


Fig. 10 : amostra com aglutinação positiva - LCMPOA/UFF/2013

Fig. 11: amostra com aglutinação negativa LCMPOA/UFF/2013

Os resultados da contagem de *E.coli* foram obtidos, conforme orientações inseridas no Anexo IV da IN 62 (BRASIL, 2003).

Seguindo as orientações de Bauer et al. (1966), procedeu-se a prova de sensibilidade antimicrobiana, utilizando os discos da Polisensidisc® (4x6 DME) nos cultivos estocados para esta finalidade.

4.3.1.2 Contagem e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva (BRASIL, 2003).

As diluições das amostras foram semeadas em ágar Baird-Parker, utilizando-se a técnica de “spread plate” para o espalhamento da amostra em placa e incubadas na temperatura de 36 ± 1℃ durante 24 horas.

Após a incubação, realizaram-se as contagens das colônias típicas para *Staphylococcus* coagulse positiva, que são colônias negras, brilhantes com halo transparente ao redor, selecionaram-se três UFC típicas de cada placa (devido aos diferentes biotipos que podem ser encontrados em uma única placa contendo meio para isolamento), posteriormente, as colônias típicas selecionadas, foram repicadas em Ágar “Brain Heart Infusion”(BHI) e incubadas a 36 ± 1℃ por 24 horas para posterior identificação através das características morfológicas (Figura 12), tintoriais (cocos Gram positivos) e bioquímicas pela verificação da coloração pelo método de Gram e das provas de catalase e coagulase respectivamente.

As estirpes de *Staphylococcus* spp. são catalase positiva. A prova baseia-se na capacidade da enzima catalase de decompor o peróxido de hidrogênio, liberando água e oxigênio, que é evidenciado por meio da formação de borbulhas.

O teste é empregado para determinar os microrganismos produtores da enzima catalase. Esta verificação determina a distinção entre os microrganismos da família *Micrococcaceae* - catalase positiva como *Staphylococcus* spp., dos microrganismos da família *Streptococcaceae* - catalase negativa incluindo os gêneros *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp.

O teste foi realizado sobre o cultivo em ágar nutriente inclinado, gotejando uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3%.

A reação foi considerada positiva pela observação da formação de efervescência em consequência da liberação de oxigênio sobre a colônia ou massa bacteriana (Figura 13).

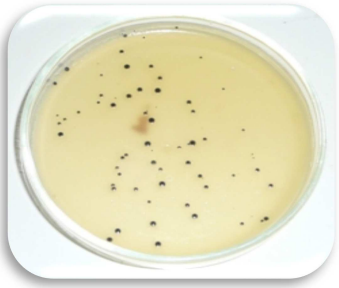


Fig. 12: Isolamento de *Staphylococcus* coagulase positiva em meio BP. LCMPOA/UFF/2013.

Fig. 13: Prova da catalase para *Staphylococcus* coagulase positiva LCMPOA/UFF/2013.

Fig. 14: Prova da coagulase para *Staphylococcus* coagulase positiva LCMPOA/UFF/2013.

A prova da coagulase baseia-se na comprovação da capacidade de coagular o plasma de coelho pela ação da enzima coagulase produzida pelo microrganismo.

O objetivo deste teste é diferenciar *Staphylococcus* spp. potencialmente patogênico de outros cocos Gram positivos, catalase negativos.

A coagulase é uma enzima capaz de coagular o plasma sanguíneo. A formação da coagulase pelo *Staphylococcus* coagulase positiva e a produção da enterotoxina está estritamente relacionada. Entretanto, juntos o teste da DNase, e o teste da coagulase são importantes indicadores da patogenicidade das cepas de *Staphylococcus* spp.

Para realização desta prova, foram utilizadas as colônias cultivadas em BHI, em triplicata, e o plasma de coelho desidratado dissolvido em 3 mL de água destilada e congelado com EDTA ou oxalatado. Foram adicionados 0,2 mL desta solução em condições de estéreis, homogeneizados com 0,2 mL da cultura em caldo infusão cérebro coração, posteriormente incubados a 36 ± 1℃ por 24 horas. Procedeu-se a leitura após incubação, inclinando lentamente o tubo sem homogeneizar para avaliar a formação de grumos ou coágulo uniforme (Figura 14). Nos tubos onde ocorreu a formação de grumos ou coágulo uniforme o resultado foi considerado positivo.

Os resultados da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foram obtidos, conforme orientações descritas no Anexo IV da IN 62 (BRASIL, 2003).

Seguindo as orientações de Bauer et al. (1966), procedeu-se a prova de sensibilidade antimicrobiana, utilizando os discos da Polisensidisc® (4x6 DME) nos cultivos estocados para esta finalidade.

4.3.1.3 Contagem e identificação de *Bacillus cereus* (BRASIL, 2003)

Diluições das amostras foram inoculadas em Ágar gema de ovo polimixina vermelho de fenol (MYP – HIMEDIA M6365) (Figura 15), onde foi adicionada gema de ovo para a verificação da produção de lecitinase pelo *B. cereus*.

A polimixina B é um agente seletivo que atuará na microbiota acompanhante.

Este meio também possui manitol, um carboidrato não degradado pelo *B cereus* e o corante vermelho de fenol como indicador.

A incubação das placas foi realizada a 30°C por 48 horas.

Após o tempo de incubação, foram selecionadas colônias típicas deste microrganismo para realização de provas bioquímicas e identificação do *B. cereus* pela verificação da produção de hemolisina, motilidade em meio semi-sólido, redução do nitrato a nitrito, provas da catalase, amilase, gelatinase e Voges Proskauer (VP).

A bacterioscopia também foi utilizada como ferramenta para identificação do *B. cereus,* um bastonete curto Gram-positivo, com extremidades quadradas dispostos em cadeias, com esporos centrais ou subterminais (Figura 16).

Os resultados da contagem (Figura 17) de *B. cereus*. foram obtidos, conforme orientações descritas no Anexo IV da IN 62 (BRASIL, 2003).

Seguindo as orientações de Bauer et al. (1966), procedeu-se a prova de sensibilidade antimicrobiana, utilizando os discos da Polisensidisc® (4x6 DME) nos cultivos estocados para esta finalidade.

Fig. 15: Meio MYP– *Bacillus cereus* - LCMPOA/UFF/2013.

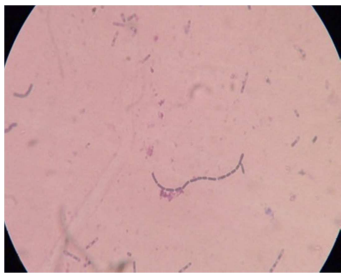


Fig. 16: Aspectos morfotintoriais do *Bacillus cereus*- LCMPOA/UFF/2013.

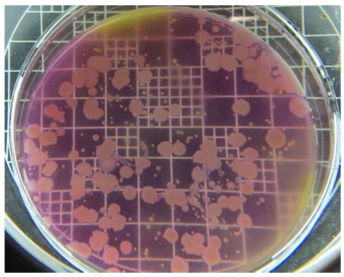


Fig. 17: Meio MYP – contagem de *Bacillus cereus* - LCMPOA/UFF/2013.

4.3.1.4. Isolamento, identificação de *Salmonella* spp.

Para isolamento da *Salmonella,* utilizou-se as colônias características para esta bactéria obtidas no plaqueamento das amostras no meio “Rapid Hicoliform” (HIMEDIA M 1453) (Figuras 18, 19) no ensaio para isolamento de coliformes totais e termotolerantes, *Escherichia coli* (EC), identificando-se simultaneamente a *Escherichia coli* e a *Salmonella* spp.

Neste meio de cultura as colônias características da *Salmonella,* apresentam-se transparentes (Figura 20).

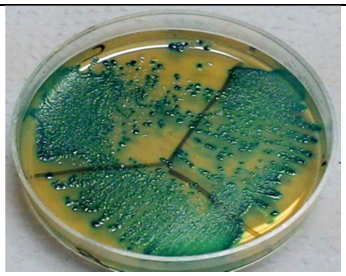


Figura18 : Isolamento de *Salmonella* spp meio “Rapid Hicoliform”.. LCMPOA/UFF/2013.

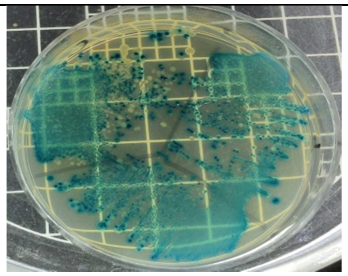


Figura19 : Isolamento de *Salmonella* spp meio “Rapid Hicoliform”.. LCMPOA/UFF/2013.

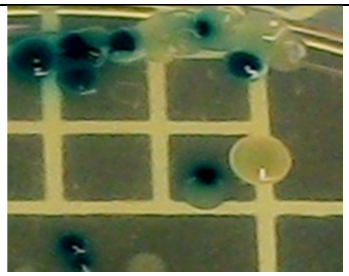


Figura20 : Colônia transparente sugestivo para *Salmonella* spp. Meio “Rapid Hicoliform”. LCMPOA/UFF/2013.

Desta forma, as colônias suspeitas foram semeadas em Ágar Triplo Sugar Iron (TSI) para a triagem. Àquelas que obtiveram crescimento característico, foram semeadas em Ágar nutriente para verificação das características morfo-tintoriais e pureza da cultura

Após as etapas de triagem, foi realizada a sorologia, utilizando o soro *Salmonella* spp. polivalente somático (PROBAC do BRASIL LTDA).

Três colônias típicas de *Salmonella* spp. foram selecionadas e repicadas em tubos contendo APC, incubadas a 36 ± 1℃ por 24 horas para purificação da cultura. Posteriormente, foram submetidas às provas bioquímicas para sua diferenciação das estirpes de *Proteus* spp.

- Reações em ágar TSI:

Inoculou-se o ágar através de picada profunda e estriamento na superfície inclinada do bisel, logo após foram incubados a 36 ± 1ºC por 24 horas. Neste ágar estão presentes a glicose, sacarose e a lactose. A glicose por ser um monossacarídeo e estar em menor concentração do que os demais é rapidamente fermentada, em anaerobiose, formando ácido na porção inferior do tubo, o meio torna-se amarelo, indicando a mudança de pH pela viragem do indicador vermelho de fenol. Esta é uma característica de todos os membros da família Enterobacteriaceae, a fermentação da glicose com produção de ácido. Na porção superior, onde se forma um bisel no meio de cultura, ocorre a fermentação aeróbia da glicose e formação do ácido pirúvico, que é posteriormente degradado a CO_2 e água. Com relação à utilização da sacarose e lactose, o meio permanece inalterado, pois a maioria das salmonelas não os fermenta. Desta forma a glicose é rapidamente esgotada, então a *Salmonella* spp. passa a degradar aerobiamente o substrato proteico presente, produzindo amônia (NH3), conferindo ao meio um pH alcalino, e consequente modificação da coloração do bisel para rosa intenso.

A maioria das salmonelas apresenta no TSI as seguintes reações:

- Ácido na base, com ou sem produção de gás. = base amarela
- Alcalino ou inalterado no bisel. = bisel rosa intenso ou inalterado
- Com produção de H2S = coloração escura na porção intermediária

- Descarboxilação da lisina

A maioria das salmonelas é capaz de produzir lisina descarboxilase, apenas quatro por cento das cepas de *Salmonella* não descarboxilam esta enzima (BRASIL, 2003)

Para esta prova cada cultura sugestiva para *Salmonella* spp. e *Proteus* spp. foi inoculada em tubo inclinado de Ágar “Lisine Iron Agar” (LIA) (MERCK ® 11640), por picada profunda e estriamento na superfície. Em seguida, incubadas a 36 ± 1ºC por 24 horas.

A primeira reação a ocorrer é a fermentação da glicose, produção de ácido, conferida pela coloração amarela através do indicador púrpura de bromo cresol. Em um segundo momento, ocorre a descarboxilação da lisina resultando na produção da cadaverina e CO_2, conferindo alcalinidade ao meio observada pelo aparecimento da coloração violeta pelo mesmo indicador, neste caso a prova é considerada positiva e viragem do indicador para violeta, resultando em teste positivo.

- Comportamento no meio Motilidade Indol Sulfito (SIM)

Com o auxílio de uma agulha as colônias foram inoculadas com uma picada no terço superior do meio SIM (Fluka® 85438), incubadas a 36 ± 1ºC por 24 horas.

A motilidade, uma característica da maioria das salmonelas, pode ser observada pelo crescimento difuso no meio, além desta, observa-se também a produção de sulfito de hidrogênio reagindo com o citrato de ferro e amônio, formando um precipitado preto insolúvel, o H_2S.

A produção de Indol pela enzima triptofanase a partir do triptofano, um aminoácido presente no meio de cultura também foi observada. Para verificar esta produção foram adicionadas duas gotas de Reativo de Kovac’s. Em casos positivos, forma-se um anel vermelho na superfície do meio (resultante da reação entre o indol e o dimetil-amino-benzaldeído contido nesse reativo). Esta prova é quase sempre negativa para *Salmonella,* pois a bactéria não produz a enzima triptofanase, neste caso, pode-se observar a formação de um halo amarelo na superfície do meio.

- Desaminação da fenilalanina

As culturas sugestivas da presença de *Salmonella* spp. e *Proteus* spp. foram inoculadas por estriamento na superfície, com auxílio de agulha, em um tubo inclinado com Ágar fenilalanina (Difco® 7450-01-9) e incubadas a 36 ± 1ºC por 24 horas.

Após a incubação, foi realizada a leitura, ao mesmo tempo, a adição de cloreto férrico a 10%. A desaminação da fenilalanina origina o ácido fenil pirúvico que ao reagir com o

cloreto férrico forma um composto verde na superfície, facilmente observável, porém, esta prova é negativa para a *Salmonella* spp*.,* pois suas espécies não desaminam a fenilalanina como ocorre com as espécies de *Proteus*.

4.3.1.5 Detecção de *Cronobacter* spp.

Para a detecção de *Cronobacter* spp. utilizou-se o método ISO/TS 22964 modificado.

O princípio fundamenta-se na detecção da alfa-glicosidase produzida pela *Cronobacter* spp., uma particularidade que a diferencia das outras enterobactérias. A enzima decompõe os substratos presentes nos meios cromogênicos como o 5-bromo-4-cloro-3-indolil-aD-glucopiranósido ou semelhantes, produzindo colônias azuis (Figura 21), características para *Cronobacter* spp.

Esta metodologia dividiu-se em quatro etapas, cujos procedimentos analíticos serão descritos na sequência. A primeira etapa, consistiu no pré-enriquecimento com um meio líquido não seletivo, a Água Peptonada Tamponada (APT), na segunda fase ocorreu o enriquecimento seletivo com o Caldo Lauril Sulfato Triptose Modificado Vancomicina (mLST-V) , posteriormente a etapa do plaqueamento diferencial com a utilização de um meio cromogênico, o ESIA (*Enterobacter sakazakii* Isolation Agar) na quarta e última etapa procede-se a identificação bioquímica. Na terceira etapa realizou-se uma modificação, utilizando para o plaqueamento diferencial o Ágar “HiCrome™ *Cronobacter* spp*”*. Modificado em substituição ao ESIA, assim como se utilizou duas temperaturas para incubação, tanto no enriquecimento seletivo, como no plaqueamento diferencial. Em ambos a incubação foi realizada concomitantemente a 36 ± 1℃ /24+2h e 44±0,5℃/24+2h. Segue a sequência dos procediment os:

a) Pré-enriquecimento: As amostras foram homogeneizadas em Água Peptonada Tamponada (ATP) diluídas à concentração 1:10 e incubadas a 36 ± 1℃ /18+2h.
b) Enriquecimento seletivo: Forma transferidos 0,1mL do APT para 10mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose Modificado Vancomicina (mLST-V) e incubados à 44±0,5℃/24+2h e também à 36 ± 1℃ /24+2h.

c) Plaqueamento diferencial: foram realizadas estrias de esgotamento *do mLST-V* em uma placa de Ágar *HiCrome™ Cronobacter* spp. modificado, após incubadas à 44+1℃/24+2h e também à 36 ± 1℃ /24+2h (Figura 22).

d) Ensaio confirmativo**.** As colônias características foram selecionadas e inoculadas em uma placa com Ágar Tripticase de Soja (TSA) e incubadas a 25 ± 1℃/44-48h, na presença de colônias típicas (pigmentação amarela) realizou-se o teste de confirmação bioquímica miniaturizada, utilizando a galeria Bactray® (I e II).

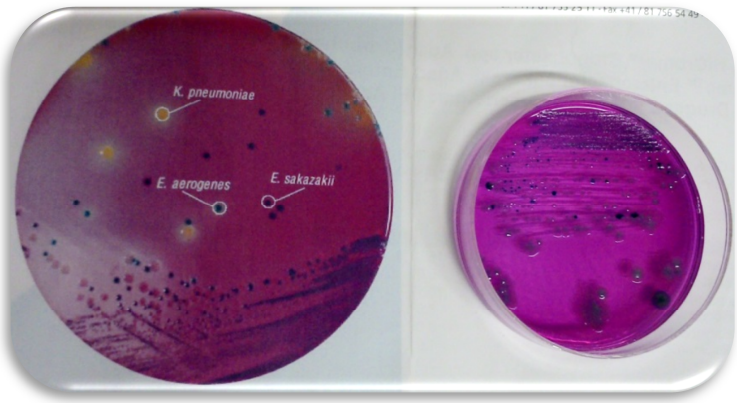


Fig. 21: Isolamento de *Cronobacter* spp.(Colônias azuis) Meio "HiCrome™*Cronobacter* spp". Modificado. LCMPOA/UFF/2013.

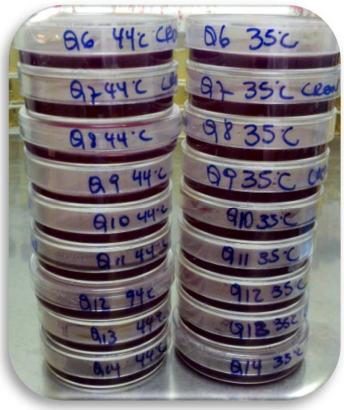


Fig. 22:"HiCrome™ *Cronobacter* spp". Modificado. LCMPOA/UFF/2013.

- <u>Comportamento bioquímico da *Cronobacter* spp.(RICHARD, 1984)</u>

O perfil bioquímico da Cronobacter spp. encontra-se resumido na Tabela 18 (APÊNDICES). Algumas características são comuns às espécies do gênero Enterobacter. A Cronobacter spp. utiliza o citrato como única fonte de carbono, o qual quando metabolizado, resulta num produto alcalino de coloração azul ou verde azulado (CIT). Produz acetoína pela degradação da glicose, detectada pelo aparecimento da cor vermelha ou rosa decorrente da reação do complexo de hidróxido de potássio e alfa naftol (VP). Desamina a fenilalanina (fenilalanina desaminase) produzida pelo ácido pirúvico, formando uma coloração verde em presença de cloreto férrico. Forma galactose pela hidrólise da beta-galactosidase (o-nitrofenol-beta-d-galacto-piranoside), desenvolvendo a cor amarela na presença do o-nitrofenol (ONPG). Transforma a arginina em citrulina e amônia pela arginina dehidrolase (ADH), elevando o pH do

sistema, observado pela mudança da cor do indicador de amarelo para púrpura. Decompõe a lisina num composto básico de amina primária (cadaverina) e CO2 pela lisina descarboxilase (LDC), igualmente percebido pela elevação do pH do sistema e transforma a mudança da cor do indicador de amarelo para púrpura. Transforma a ornitina num composto básico de amina primária (putrescina) e CO_2 pela ornitina descarboxilase, elevando o pH do sistema. Utiliza os carboidratos arabinose (ARA), sacarose (SAC) e rafinose (RAF), produzindo ácido. Porém não utiliza o adonitol (ADN) e o sorbitol (SOR) Pode apresentar resultado positivo ou negativo para a utilização de malonato (MAL) como fonte de carbono, resultando em um produto alcalino. Não produz H_2S pela hidrólise enzimática do tiossulfato, formando precipitado negro na presença de citrato férrico. Não produz a enzima urease para hidrolisar a uréia e formação de amônia e CO_2. Não metaboliza o triptofano, portanto não há formação de indol. Ao fermentar a glicose, pode produzir gás a 35-37ºC, mas pode não produzir gás a 44 ± 0,5ºC.

4.3.2 **Avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos**

As estirpes de *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp. e *Cronobacter* spp. foram avaliadas frente aos agentes antimicrobiano utilizados rotineiramente em infecções e intoxicações alimentares, tendo em vista os riscos que as estirpes resistentes venham apresentar no caso da ocorrência de doenças alimentares.

Culturas com estas bactérias foram preparadas com turvação em escala nefelométrica de Mc Farland (equivalente a $3x10^8$ UFC/mL) que é o padrão de turvação mais frequentemente utilizado nos laboratórios de microbiologia, para determinar a intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquidos.

A execução deste teste seguiu os procedimentos preconizados nos critérios do “Clinical and Laboratory Standards Institute”(CLSI, 2003).

Para avaliar a sensibilidade dos microrganismos Gram negativos como *E. coli* ,*Cronobacter* spp. e a *Salmonella* spp. foram utilizados os módulos III e IV. O módulo III é constituído pelos seguintes antimicrobianos: amicacina (AMI), ampicilina (AMP), cefalotina (CFL), cefotaxima (CTX), ceftadizima (CAZ), sulfazotrin (SUT). O módulo IV:

aztreonam (ATM), cefoxitina (CFO), ceftriaxona (CRO), gentamicina (GEN), cloranfenicol (CLO) e a tetraciclina (TET).

As bactérias Gram positivas, como o *S. aureus* e o *Bacillus cereus*, foram utilizados os módulos I e IV. Este, descrito anteriormente, e o módulo I composto por:clindamicina (CLIN), eritromicina (ERI), oxacilina (OXA), penicilina G (PEN), teicoplamina (TEC).

Os resultados foram obtidos a partir das medidas dos halos de inibição do crescimento bacteriano através de um halômetro. Desta forma, as estirpes foram caracterizadas como: resistente, intermediária e sensível, em conformidade com os valores dos diâmetros da zona de resistência antimicrobiana fornecidos pelo fabricante dos antimicrobianos.

4.3.3 **Avaliação estatística**

Os dados foram analisados com auxílio do programa IBM SPSS Statistics versão 20. Foram executadas análises de correlação pelo método de Pearson para análise da variável temperatura e sua influência no desenvolvimento de colônias de *Cronobacter,* com nível de significância de 5%.

Os dados de sensibilidade ou resistência à ação de agentes antimicrobianos foram analisados pela formação de “clusters” utilizando o programa PAST 3.01. Os dados de sensibilidade aos antimicrobianos foram comparados entre as estirpes encontradas nas amostras de queijo MF e FID pelo método de Kruskal-Wallis deste mesmo programa.

5 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

5.1 COLIFORMES TOTAIS, e *E. coli*

Os resultados relacionados às contagens e sorologia de coliformes totais e *E.coli* realizadas em queijo Minas Frescal estão descritos na tabela 1.

TABELA 1 - Resultado das contagens e sorologia de coliformes totais e *E.coli* realizadas em queijo Minas Frescal (MF)

AMOSTRAS POSITIVAS	CONTAGEM Totais (UFC/g)	CONTAGEM *E.coli* (UFC/g)	PATOTIPO
Q1	>1,1 X 10^4	4,3 X 10^2	EPEC A EPEC A
Q2	1,1 X 10^4	2,4 X10^3	EPEC A EPEC A
Q3	>1,1 X 10^4	>1,1 X 10^4	EPEC A
Q4	>1,1 X 10^4	3,5 10^2	EPEC A
Q5	>1,1 X 10^4	>1,1 X 10^4	EPEC A
Q6	>1,1 X 10^4	0	----------
Q7	>1,1 X 10^4	>1,1 X 10^4	EPEC A
Q8	>1,1 X 10^4	0	----------
Q9	>1,1 X 10^4	0	----------
Q10	>1,1 X 10^4	>1,1 X 10^4	EPEC A EPEC A
Q11	>1,1 X 10^4	0	----------
Q12	>1,1 X 10^4	>1,1 X 10^4	EPEC A
Q13	>1,1 X 10^4	>1,1 X 10^4	EPEC A
Q14	>1,1 X 10^4	0	----------
Q15	>1,1 X 10^4	0	----------
Q16	>1,1 X 10^4	4,3 X10^2	EPEC A
Q17	>1,1 X 10^4	1,5 X10^2	EPEC C
Q18	>1,1 X 10^4	0	----------
Q19	>1,1 X 10^4	0	----------
Q20	>1,1 X 10^4	0	----------
Q21	>1,1 X 10^4	2,4 X 10^3	EPEC A EPEC A
Q22	>1,1 X 10^4	0	----------
Q23	>1,1 X 10^4	7,5 X 10^2	EPEC A EPEC A
Q24	>1,1 X 10^4	1,1 X 10^4	EPEC A EPEC A
Q25	>1,1 X 10^4	>1,1 X 10^4	EPEC A
Q26	>1,1 X 10^4	>1,1 X 10^4	EPEC A
Q27	>1,1 X 10^4	0	----------
Q28	>1,1 X 10^4	1,1 X 10^4	EPEC A
Q29	>1,1 X 10^4	2,4 X 10^3	EPEC A EPEC A
Q30	>1,1 X 10^4	>1,1 X 10^4	EPEC B

Na análise dos resultados, constata-se que 15 amostras de queijo MF possuíam valores superiores ao estabelecido pela legislação para queijos de muito alta umidade, incluindo o queijo Minas Frescal. O limite máximo permitido para coliformes a 45℃ é da ordem de 5 x 10^2 UFC/g de alimento (BRASIL, 1996). Os valores apresentados apontam que 50% das amostras analisadas encontravam-se no intervalo de 7,5 x 10^2 e > 1,1 x 10^4UFC/g, portanto, impróprias para o consumo. Estes dados são semelhantes aos encontrados por Campos et. al. (2006) os quais observaram a apresença de *E. coli* em 17 (70,8%) das 24 amostras de queijo Minas Frescal coletadas, e destas isolaram 25 estirpes patogênicas.

Na tabela 1 observam-se ainda os resultados da análise sorológica que foram exclusividade para o patotipo EPEC, encontrado em 100% das amostras em não conformidade com a legislação e em 56,67% das analisadas, assim como Okura em 2010 avaliando o perfil microbiológico de queijo MF encontrou cinco estirpes em 330 amostras analisadas, todas do patotipo EPEC e dos sorogrupos O86, O126 e O128.

Dias (2012) ao pesquisar amostras de queijo MF encontrou valores semelhantes aos desta pesquisa, relacionados ao patotipo isolado (EPEC), 12,5% estavam contaminadas por *E. coli* e destas 100% eram enteropatogênicas. O autor afirma que a presença de EPEC em queijo MF representa um risco à saúde pública, pois estas estirpes apresentaram resistência a antimicrobiamos.

Este resultado também se assemelha ao encontrado por Alves (2013), ao avaliar as condições higiênico-sanitária de amostras de queijos Minas Frescal artesanais comercializados em feiras livres da cidade de Volta Redonda – RJ, encontrou 56,6% das amostras analisadas estavam contaminadas por coliformes termotolerantes, 100% destas impróprias ao consumo, cujo sorotipo preponderante foi o EPEC em 71 % dos casos positivos.

Portanto, a presença de *E. coli* em 50% das amostras analisadas representa um risco potencial ao consumidor, pois além de causar enfermidades é um indicativo da contaminação por outras enterobactérias igualmente patogênicas, evidenciando que existem falhas higiênico-sanitárias na fabricação do queijo Minas Frescal que precisam ser minimizadas para garantir um produto de qualidade satisfatória ao consumidor.

Os resultados relacionados às contagens e sorologia de coliformes totais e *E.coli* realizadas em Fórmulas Infantis Desidratadas estão descritos na tabela 2.

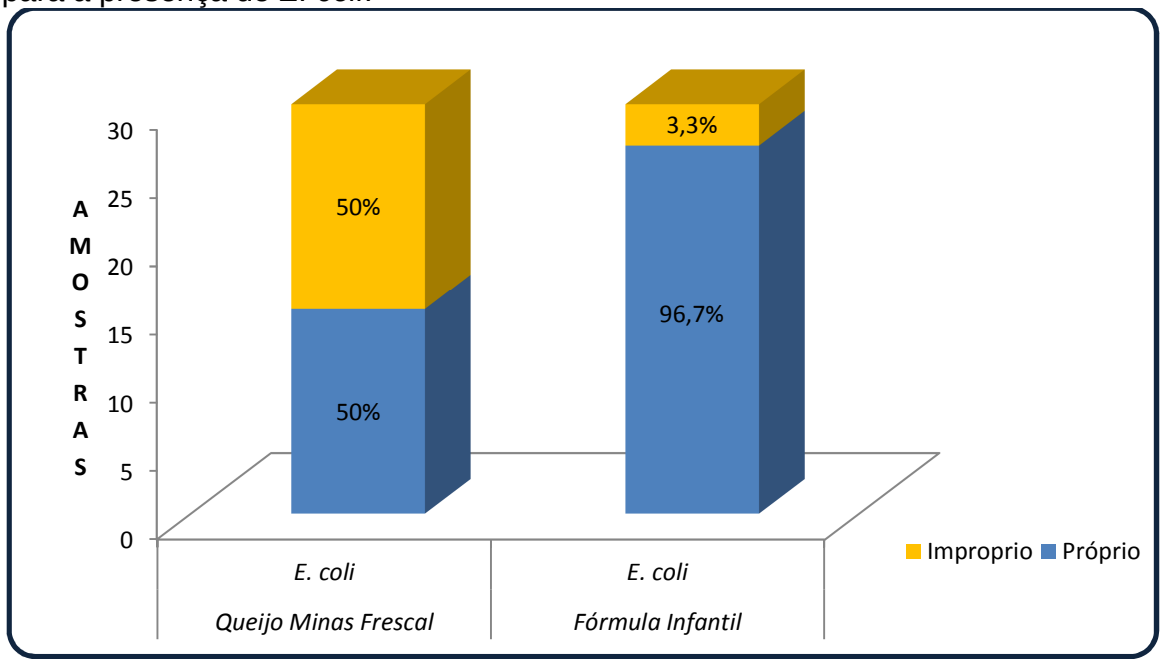
TABELA 2 - Resultado das contagens e sorologia de coliformes totais e *E.coli* realizadas em Fórmulas Infantis Desidratadas (FID)

AMOSTRAS **FID**	CONTAGEM Totais (UFC/g)	CONTAGEM *E.coli*(UFC/g)	PATOTIPO	SOROGRUPO
FI 1	$4,6 \times 10^3$	0	----------	
FI 2	$4,6 \times 10^3$	$4,3 \times 10^2$	EPEC B EPEC B EPEC B EPEC B	O114 O114 O158 O158
FI 4	$3,0 \times 10^3$	0	----------	

Na avaliação dos resultados relacionados aos achados de coliformes totais e *E.coli* percebe-se que os valores das amostras FI 1, FI 2 e FI 4 para coliformes totais estão superiores ao estabelecido na legislação (RDC n° 12) para alimentos infantis, incluindo as fórmulas desidratadas. Conforme os valores de referência tolerados para amostra indicativa tem-se a grandeza de 10 UFC/g, portanto um valor bem inferior aos encontrados. Como agravante foram isoladas, na amostra FI 2, quatro estirpes enteropatogênicas de *E.coli* (EPEC B) caracterizadas através da sorologia como pertencentes aos sorogrupos O 114 e O 158. Na legislação vigente, a presença de *E.coli* não é admitida neste alimento.

Jay (2005) alertou que a presença de EPEC em alimentos pode representar um risco quando consumida por indivíduos sensíveis a este grupo de bactérias, geralmente as crianças são as mais atingidas. Assim constatou-se que 10% das amostras de FID estavam em não conformidade com a legislação brasileira para coliforme a 35℃ e 3,33% para coliforme a 45℃(Figura 23), podendo oca sionar graves consequências aos consumidores, pois as fórmulas analisadas destinavam-se às crianças até um ano de idade. Do mesmo modo, informações recentes da "World Gastroenterology Organisation Global Guideline" (2012) alegaram que a *E. coli* enteropatogênica (EPEC) atinge principalmente as crianças menores dois anos, apresentando diarreia persistente. Os dados desta pesquisa comprovam o risco existente, pois apesar de estar em apenas 3,3% das amostras sua presença é inapropriada ao alimento,
podendo ser agravada, considerando a multiplicação desde a reconstituição do produto até o consumo final.

Figura 23 - Frequência dos alimentos em não conformidade com padrões fixados para a presença de *E. coli*.



Os resultados referentes ao comportamento das estirpes de *E. coli* patogênicas isoladas em queijo Minas Frescal e Fórmulas Infantis Desidratadas perante aos antimicrobianos estão descritos na tabela 3.

TABELA 3 - Comportamento das dez estirpes de *E. coli* patogênicas isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID)

ANTIMICROBIANO	COMPORTAMENTO DAS ESTIRPES DE *E. coli* (10 estirpes: 7QMF/ 3FID)		
	SENSÍVEL MF / FID	INTERMEDIÁRIO MF / FID	RESISTENTE MF / FID
AMI	6(85,7%) / 2(66,7%)	------- / -------	1(14,3%) /1 (33,3 %)
AMP	2(28,6%) / -------	------- / -------	5(71,4%) / 3(100%)
ATM	1(14,3%) / 3(100%)	------- / -------	6(85,7%) / -------
CFL	2(28,6%) / 2(66,7%)	1(14,3%) / -------	4(57,1%) / 1(33.3%)
CTX	1(14,3%) / -------	------- / -------	6(85,7%) / 3(100%)
CAZ	3(42.8%) / 1(33.3%)	------- / 1(33.3%)	4(57,1%) / 1(33.3%)
CFO	1(14,3%) / 3(100%)	------- / -------	6(85,7%) / -------
CRO	3(42.8%) / 3(100%)	------- / -------	4(57,1%) / -------
CLO	6(85,7%) / 3(100%)	------- / -------	1(14,3%) / -------
GEN	4(57,1%) / 3(100%)	------- / -------	3(42.8%) / -------
SUT	4(57,1%) / 1(33.3%)	------- / -------	3(42.8%) / 2(66,7%)
TET	4 (57,1%)/ 3(100%)	------- / -------	3 (42.8%) / -------

Interpretando-se os dados inseridos na tabela avalia-se que 100% das estirpes de *E coli*. patogênicas isoladas das amostras de FID foram resistentes à ampicilina (AMP) e à cefotaxima (CTX), 66,7% exibiram o caráter resistente ao sulfazotrim (SUT), finalmente 33,3% resistentes à amicacina (AMI). Entretanto 100% foram carcterizados como sensíveis aos antimicrobianos aztreonam (ATM), cefoxitina (CFO), ceftriaxona (CRO), cloranfenicol (CLO), gentamicina (GEN) e tetraciclina (TET) e apenas 33,3 % com resistência intermediária à ceftazidima (CAZ).

Com relação às estirpes isoladas em amostras de queijo MF, 85,7% foram resistentes ao aztreonam (ATM) à cefotaxima (CTX) e à cefoxitina (CFO), 71,4% à ampicilina (AMP), 57,1% à cefalotina (CFL) à ceftazidima (CAZ) e à ceftriaxona (CRO), 42,8% resistentes à gentamicina (GEN) ao sulfazotrim (SUT) e à tetraciclina (TET). 85,7 a 14,3% apresentaram-se sensíveis aos demais antimicrobianos e 57,4% com resistência intermediária à cefalotina.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Okura (2010) em sua pesquisa, pois 37,8 % das estirpes isoladas em queijo MF com SIF e 32,7% das isoladas de queijo MF sem SIF foram resistentes a tetraciclina Assemelham-se também com os resultados de Baccaro et al. em 2002 quando apontaram a resistência de 86,8% das estirpes de *E. coli* em queijo MF à ampicilina,

Alves (2013) obteve resultados análogos ao desta pesquisa ao constatar que 50% das estirpes de *E. coli* isoladas em queijo Minas Frescal eram resistentes à ampicilina, ceftazidima e ao aztreonam, contudo a eficiência da tetraciclina apresentou resultados distintos aos encontrados por este autor e por Campos et al. (2006). Neste estudo 42,8 % das estirpes foram resistentes à tetraciclina enquanto Alves (2013) encontrou apenas 11% e Campos et al. (2006) apenas 8% das estirpes com a mesma característica. Entretanto, os resultados com relação a eficiência da tetraciclina aproximam-se dos valores encontrados por Barreto et. al (2012), ao analisar as estirpes isoladas em leite “in natura” descobriu que 57,9% eram resistentes a este antimicrobiano

A amicacina e o cloranfenicol, conforme figura 27 (APÊNDICES) foram os antimicrobianos mais eficientes para as estirpes de *E. coli* isoladas em queijo MF, são resultados similares aos encontrados por Alves (2013) ao encontrar 89% das estirpes estudadas inibidas pelo cloranfenicol e 52% inibidas por amicacina e 41% por ceftriaxona. Neste estudo 85,7% das estirpes foram sensíveis ao cloranfenicol e amicacina e 42,8% por ceftriaxona.

Outro aspecto importante sobre a avaliação da sensibilidade das estirpes isoladas aos antimicrobianos é a multirresistência. Estes dados encontram-se na tabela 13 (APÊNDICES). Constata-se que 100% das estirpes isoladas nas Fórmulas Infantis apresentaram-se multirresistentes e 85,71% das estirpes isoladas em queijo Minas Frescal possuíam a mesma característica. Assim como apresentado por Alves (2013) ao encontrar 86% desta característica nas estirpes de *E. coli* isoladas em queijo Minas Frescal, ao contrário desta pesquisa, não foram encontrados dados na literatura sobre a multirresistência de estirpes de *E coli* (EPEC), isoladas de Fórmulas Infantis. Estes resultados são compatíveis com os encontrados por diversos autores em outros alimentos (ALVES, 2013; FRANCO, 2002; MANTILLA et al., 2008). Sugere-se a realização do teste de sensibilidade antimicrobiana para infecções causadas por estirpes enteropatogênicas, pois os sorotipos frequentemente isolados são resistentes a maioria dos antimicrobianos comumente utilizados

5.2 *Staphylococcus* coagulase positiva

Os resultados relacionados às contagens e bioquímica para *Staphylococcus* coagulase positiva realizadas em queijo Minas Frescal e Fórmulas Infantis Desidratadas estão descritos na tabela 4.

TABELA 4 - Resultado das contagens e bioquímica de *Staphylococcus* coagulase positiva realizadas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID)

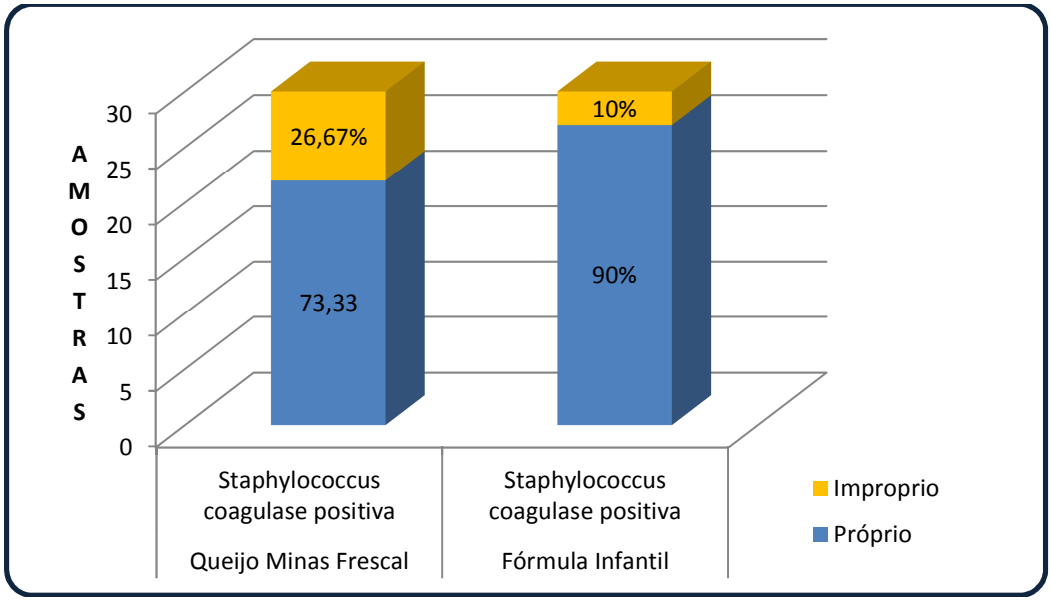
AMOSTRAS **QMF**	CONTAGEM (UFC/g)	COAGULASE POSITIVA	CATALASE
Q1	$1,8 \times 10^6$	+++	Positiva
Q2	$2,0 \times 10^3$	+++	Positiva
Q3	$8,4 \times 10^6$	+++	Positiva
Q4	$7,6 \times 10^6$	+++	Positiva
Q5	$8,4 \times 10^6$	+++	Positiva
Q6	$2,9 \times 10^7$	s/ coagulação	Negativa
Q7	$2,8 \times 10^6$	s/ coagulação	Negativa
Q8	$3,0 \times 10^5$	s/ coagulação	Negativa
Q9	$7,2 \times 10^5$	s/ coagulação	Negativa
Q10	$3,2 \times 10^7$	s/ coagulação	Negativa
Q11	0	s/ coagulação	Negativa
Q12	$2,8 \times 10^6$	s/ coagulação	Negativa
Q13	0	s/ coagulação	Negativa
Q14	$1,7 \times 10^6$	s/ coagulação	Negativa
Q15	0	s/ coagulação	Negativa
Q16	$2,0 \times 10^4$	s/ coagulação	Negativa
Q17	$1,0 \times 10^4$	s/ coagulação	Negativa
Q18	$4,0 \times 10^2$	s/ coagulação	Negativa
Q19	$2,0 \times 10^3$	s/ coagulação	Negativa
Q20	$3,4 \times 10^6$	s/ coagulação	Negativa
Q21	$3,0 \times 10^8$	s/ coagulação	Negativa
Q22	$9,4 \times 10^3$	s/ coagulação	Negativa
Q23	$6,0 \times 10^3$	s/ coagulação	Negativa
Q24	$1,2X\ 10^4$	s/ coagulação	Negativa
Q25	$3,8 \times 10^8$	s/ coagulação	Negativa
Q26	$1,5 \times 10^8$	s/ coagulação	Negativa
Q27	$1,5 \times 10^8$	s/ coagulação	Negativa
Q28	$1,5 \times 10^8$	+++	Positiva
Q29	$1,5 \times 10^4$	+++	Positiva
Q30	$1,7 \times 10^8$	+++	Positiva
AMOSTRAS **FID**	CONTAGEM (UFC/g)	COAGULASE POSITIVA	CATALASE
FI 1	$1,5 \times 10^4$	s/ coagulação	Negativa
FI 2	$3,3 \times 10^6$	s/ coagulação	Negativa
FI 7	$2,0 \times 10^3$	+++	Positiva
FI 9	$1,0 \times 10^2$	+++	Positiva
FI 10	$1,0 \times 10^4$	s/ coagulação	Negativa
FI 18	$1,0 \times 10^2$	+++	Positiva

Na legislação brasileira está estabelecido que este microrganismo deva estar ausente nas Fórmulas Infantis, em contrapartida a tolerância para a amostra indicativa de queijo MF é de 5 x 10^2 UFC/g de alimento, contudo nesta pesquisa a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva foi observada em 10% das amostras de FID e 26,67% das amostras de queijo MF (Figura 24) com valores superiores aos limites aprovados. Estes resultados provavelmente possam estar relacionados às falhas higiênicas e tecnológicas durante a fabricação destes produtos, pois o *Staphylococcus* coagulase positiva pode ser isolado em diversas partes do corpo humano, podendo ser veiculados não só para o alimento, mas para as superfícies e equipamentos da indústria em decorrência da manipulação inadequada da matéria prima. Esta hipótese também foi defendida por Loguérsio e Aleixo (2001) quando encontraram em seus estudos a presença de *S. aureus* além dos limites aceitáveis em 96,67% das amostras de queijo MF, um valor bastante superior ao encontrado nesta pesquisa. Com estes resultados, os autores supunham que o tratamento térmico do leite estivesse sendo realizado de forma ineficiente, consideraram uma contaminação pós-tratamento, devido à manipulação ou contato com superfícies não sanitizadas, ou a utilização de leite cru, não pasteurizado, na fabricação do queijo.

Pinto et. al. (2011) detectaram valores semelhantes aos encontrada neste trabalho, considerando que 25% das amostras de queijo MF com inspeção Federal impróprias ao consumo, enquanto as amostras do mesmo queijo fabricado artesanalmente e sem inspeção foram consideradas 100% irregulares a este parâmetro.

Da mesma forma Salotti et. al. (2006) confirmaram 20% e 10% das amostras de queijo MF artesanais e inspecionadas, respectivamente, com valores superiores aos da legislação vigente, contudo verifica-se que a ação da fiscalização pode contribuir para o cumprimento das boas práticas de fabricação e, sob este aspecto, melhorar a qualidade do produto final.

Figura 24: Frequência dos alimentos em não conformidade com padrões fixados para contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva:



Os resultados referentes ao comportamento das estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas em queijo Minas Frescal e Fórmulas Infantis Desidratadas perante aos antimicrobianos estão descritos na tabela 5.

TABELA 5 - Comportamento das estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva Isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) perante aos antimicrobianos

ANTIMICROBIANO	COMPORTAMENTO DAS ESTIRPES de *Staphylococcus* coagulase positiva (10 estirpes: 7MF/ 3FID)		
	SENSÍVEL MF / FID	INTERMEDIÁRIO MF / FID	RESISTENTE MF / FID
CLINDAMICINA	2(28,6%) / 2(66,7%)	------- / -------	5(71,4%) / 1(33,3%)
ETITROMICINA	2(28,6%) / 1(33,3%)	------- / 1(33,3%)	5(71,4%) / 1(33,3%)
OXACICLINA	------- / 2(66,7%)	------- / -------	7(100%) / 1(33,3%)
PENICILINA	2(28,6%) / 1(33,3%)	------- / -------	5(71,4%) /2(66,7%)
TEICOPLAMINA	2(28,6%) / 1(33,3%)	------- / 1(33,3%)	5(71,4%) / 1(33,3%)
CLORANFENICOL	4(57,1%) /3(100%)	------- / -------	3(42,8%) / -------
CEFTRIAXONA	------- / 3(100%)	------- / -------	7(100%) / -------
TETRACICLINA	------- / 2(66,7%)	------- / 1(33,3%)	7(100%) / -------
GENTAMICINA	3(42,8%) / 3(100%)	------- / -------	4(57,1%) / -------
CEFOXITINA	4(57,1%) / 3(100%)	------- / -------	3(42,8%) / -------
VANCOMICINA			/ xxx
AZTREONAM	*****/ -------		--------- / 3(100%)

Observa-se nesta tabela 100% das estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas das amostras de FID foram resistentes ao aztreonam (ATM), 66,7% à penicilina e 33,3% à clindamicina (CLIN), à eritromicina (ERI), à oxaciclina (OXA) e á teicoplamina (TEC). No entanto, 100% mostraram-se sensíveis aos antimicrobianos cloranfenicol (CLO), à ceftriaxona (CRO), Gentamicina (GEN) e cefoxitina (CFO), 66,7% à clindamicina (CLIN), à oxaciclina (OXA), e à tetraciclina (TET). Apenas 33,3 % com resistência intermediária à eritromicina (ERI), à teicoplamina (TEC) e à tetraciclina (TET).

Com relação às estirpes isoladas em amostras de queijo MF, 100% foram resistentes à oxaciclina (OXA) à ceftriaxona (CRO) e à tetraciclina (TET), 71,4% exibiram o caráter resistente à clindamicina (CLIN), à eritromicina (ERI), à penicilina (PEN) e à teicoplamina (TEC). 57,1% resistentes à Gentamicina (GEN), 42,8% à cloranfenicol (CLO).

Sobre a multirresistência, verifica-se na tabela 14 (APÊNDICES) que 66,7% das estirpes isoladas nas Fórmulas Infantis se comportaram como multirresistentes e 100% das estirpes isoladas em queijo Minas Frescal possuíam a mesma característica.

Muitos estudos foram corroborados com os resultados obtidos nesta pesquisa. Ribeiro e Tavares (2000) também demonstraram que a maioria das doenças hospitalares causadas por *Staphylococcus* são provenientes de estirpes multirresistentes aos antimicrobianos.

Di Primio (2012) constatou que a oxacilina e a penicilina foram menos eficientes às estirpes de *S.* coagulase positiva. Neste estudo observou-se que as estirpes isoladas de amostras de queijo Minas Frescal foram 100% resistentes à oxaciclina, confirmando o resultado supracitado. Os resultados também foram compatíveis com os encontrados por Silva (2008) ao pesquisar o perfil de sensibilidade antimicrobiana em queijo Minas Frescal, a penicilina a clindamicina e a oxaciclina foram os antimicrobianos menos eficientes. Constata-se que cepas multirresistentes aos antimicrobianos estão sendo selecionadas tanto nos produtos de origem animal pelo uso deliberado de medicamentos durante a criação e falta de fiscalização para o controle de resíduos em alimentos como pela utilização indiscriminada de antimicrobianos para o combate de doenças humanas.

5.3 *Salmonella* spp.

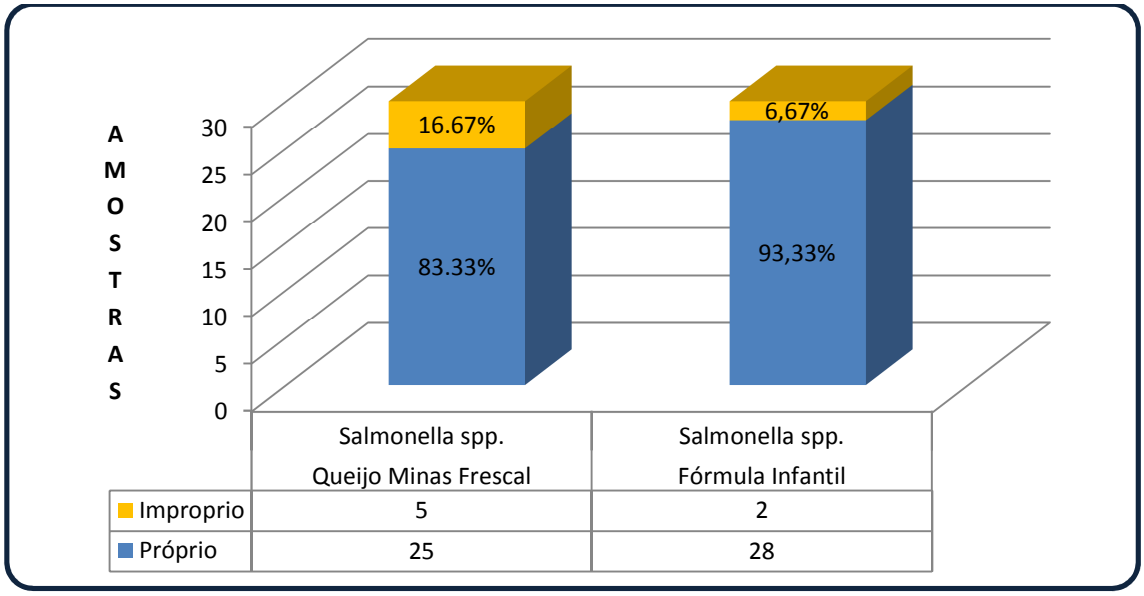
Os resultados relacionados ao isolamento de *Salmonella* spp. .realizado em queijo Minas Frescal e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) constam na tabela 6.

TABELA 6 - Resultado do isolamento de *Salmonella* spp. isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID)

Salmonella spp. Amostras Positivas	N° de estirpes isoladas
MF	
Q5	2
Q6	2
Q7	1
Q25	1
Q29	1
TOTAL	**7**
Salmonella spp. Amostras Positivas	N° de estirpes isoladas
FID	
FI 1	5
FI 2	4
TOTAL	**9**

Para este microrganismo consta na legislação a ausência tanto para queijo MF quanto para FID, entretanto a análise da tabela 6 permite verificar que a *Salmonella* spp. foi isolada em cinco amostras de queijo Minas Frescal e duas Fórmulas Infantis, logo, 16,67% dos queijos e 6,67% das fórmulas analisados estavam impróprios para consumo (Figura 25), representando um risco à inocuidade do alimento e à saúde do consumidor devido sua elevada patogenicidade. Entretanto Dionizio et.al. (2003) e Salotti et.al. (2006) demonstraram ausência para este microrganismo em suas pesquisas, atribuíram a intensa multiplicação de coliformes nos meios seletivos para *Salmonella* spp. Este fato não foi observado nesta pesquisa, pois a bactéria esteve presente tanto nas amostras de queijo como nas Fórmulas Infantis, estando em conformidade com as informações emitidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre estudos científicos que avaliaram a presença de bactérias nocivas em Fórmulas Infantis, constatando que espécies de *Salmonella* podem ser encontradas em níveis baixos nestes produtos.

Figura 25: Frequência dos alimentos em não conformidade com padrões fixados para *Salmonella* spp.



Os resultados referentes ao comportamento das estirpes de *Salmonella* spp isoladas em queijo Minas Frescal e Fórmulas Infantis Desidratadas perante aos antimicrobianos estão alocados na tabela 7.

TABELA 7: Comportamento das dezesseis estirpes de *Salmonella* spp. isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) perante aos antimicrobianos

ANTIMICROBIANO	COMPORTAMENTO DAS ESTIRPES DE *Salmonella* spp (16 estirpes: 7MF/ 9FID)		
	SENSÍVEL MF / FID	INTERMEDIÁRIO MF / FID	RESISTENTE MF / FID
AMI	7(100%) /8(88,9%)	-------/ -------	---------- / 1(11,1%)
AMP	---------- / 2(22,2%)	1(14,3%)/1(11,1%)	6(85,7%) / 6(66,7%)
ATM	5(71,4%) / 7(77,8%)	1(14,3%) / -------	1(14,3%) / 2(22,2%)
CAZ	7(100%) / 4(44,4%)	------- / 3(33,3%)	---------- / 2(22,2%)
CFL	---------- / 6(66,7%)	-------/ -------	7(100%) / 3(33,3%)
CFO	2(28,6%) / 8(88,9%)	-------/ -------	5(71,4%) / 1(11,1%)
CLO	---------- / 9(100%)	-------/ -------	7(100%) / -------
CRO	3(42,8%) / 7(77,8%)	2(28,6%)/1(11,1%)	2(22,2%) / 1(11,1%)
CTX	2(28,6%) / 1(11,1%)	4(57,1%)/3(33,3%)	1(14,3%) / 5(55,5%)
GEN	5(71,4%) / 8(88,9%)	1(14,3%) / -------	1(14,3%) / 1(11,1%)
SUT	2(28,6%) / 7(77,8%)	----------/ -------	5(71,4%) / 2(22,2%)
TET	---------- / 9(100%)	----------/ -------	7 (100%) / -------

Observa-se que 66,7% das estirpes de *Salmonella* spp isoladas das amostras de FID foram resistentes à ampicilina (AMP),55,5% das estirpes resistentes à cefotaxima (CTX), 33,3% à cefalotina (CFL), 22,2 % à aztreonam (ATM), à ceftazidima (CAZ), e ao sufazotrim (SUT), finalmente 11,1 % resistentes à amicacina (AMI), cefoxitina (CFO), ceftriaxona (CRO) e à gentamicina (GEN). Por outro lado, 100% das estirpes das Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) foram sensíveis ao cloranfenicol (CLO) e à tetraciclina (TET), 88,9% à amicacina (AMI), cefoxitina (CFO) e gentamicina (GEN), para os demais antimicrobianos a sensibilidade das estirpes de FID variou entre 11,1% a 77,8%.

Para as estirpes isoladas em amostras de queijo MF, 100% foram resistentes à cefalotina (CFL), ao cloranfenicol (CLO) e à tetraciclina (TET). Resultados de resistência foram obtidos na faixa de 85,7% a 14,3% para os outros antimicrobianos testados. Em contra partida, verifica-se que 100% das estirpes isoladas de queijo MF foram sensíveis à amicacina (AMI) e a ceftazidima (CAZ). Valores de resistência intermediária foram encontrados para a amicacina, aztreonam e gentamicina (14,3%), à ceftriaxona (28,6%) e à cefotaxima (57,1%). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Gilt-Setas et al. (2002) ao pesquisarem o comportamento desta bactéria aos antimicrobianos encontram a maior porcentagem de resistência para a tetraciclina e ampicilina. Contudo nesta pesquisa as estirpes isoladas das Fórmulas Infantis foram suscetíveis à tetraciclina e ao cloranfenicol, enquanto as estirpes provenientes das amostras de queijo MF foram mais sensíveis à amicacina e à ceftazidima e resistentes à tetraciclina e ao cloranfenicol. Constatou-se um comportamento distinto frente aos antimicrobianos entre as estirpes advindas das Fórmulas Infantis com as isoladas no queijo MF, pois as estirpes isoladas das Fórmulas Infantis foram mais sensíveis aos antimicrobianos, fato que pode estar relacionado com a tecnologia utilizada, qualidade da matéria-prima e com o controle higiênico-sanitário para a fabricação destes alimentos.

Aspectos relacionados à multirresistência podem ser observados na tabela 15 (APÊNDICES) onde 66,7% das estirpes isoladas nas Fórmulas Infantis possuíam multirresistência e 100% das estirpes isoladas em queijo Minas Frescal apresentaram a mesma característica. Estes dados são corroborados pela Organização Mundial da

Saúde (2004) ao informar que a resistência da *Salmonella* vem aumentando nos últimos anos pelo uso inadvertido dos antimicrobianos tanto para o tratamento humano como para a produção animal.

5.4 *Bacilus cereus*

Os resultados relacionados às contagens e bioquímica para *Bacilus cereus* realizadas em queijo Minas Frescal e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) estão descritos na tabela 8.

TABELA 8: Resultado das contagens e provas bioquímicas de *Bacillus cereus* realizadas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID)

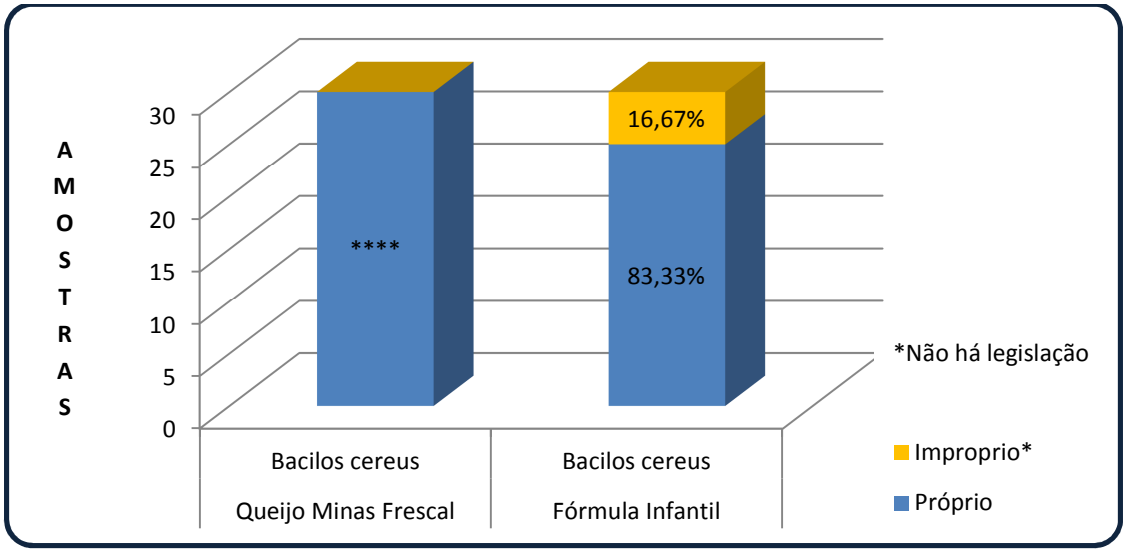
		PROVAS BIOQUÍMICAS						
AMOSTRAS	CONTAGEM (UFC/g)	Catal.	Hemol.	Amil.	VP	NO_3/ NO_2	Motil.	Gelat
MF		+	+	+	+	+	+	+
Q1	$1,8 \times 10^6$	+	+	+	+	+	+	+
Q2	$1,5 \times 10^5$	+	+	+	+	+	+	+
Q3	$1,5 \times 10^6$	+	+	+	+	+	+	+
Q4	$1,5 \times 10^5$	+	+	+	+	+	+	+
Q5	$3,4 \times 10^6$	+	+	+	+	+	+	+
Q6	$2,7 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+
Q7	$1,8 \times 10^6$	+	+	+	+	+	+	+
Q8	$3,9 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+
Q9	$3,2 \times 10^5$	+	+	+	+	+	+	+
Q10	$3,6 \times 10^5$	+	+	+	+	+	+	+
Q11	$2,5 \times 10^6$	+	+	+	+	+	+	+
Q12	$2,8 \times 10^5$	+	+	+	+	+	+	+
Q13	$4,8 \times 10^5$	+	+	+	+	+	+	+
Q14	$1,7 \times 10^6$	+	+	+	+	+	+	+
Q15	$3,9 \times 10^5$	+	+	+	+	+	+	+
Q16	$1,9 \times 10^6$	+	+	+	+	+	+	+
Q17	$1,6 \times 10^6$	+	+	+	+	+	+	+
Q18	$4,4 \times 10^5$	+	+	+	+	+	+	+
Q19	$3,0 \times 10^6$	+	+	+	+	+	+	+
Q20	$3,4 \times 10^6$	+	+	+	+	+	+	+
Q21	$2,0 \times 10^8$	+	+	+	+	+	+	+
Q22	$7,4 \times 10^5$	+	+	+	+	+	+	+
Q23	$8,3 \times 10^3$	+	+	+	+	+	+	+
Q24	$3,2X\ 10^4$	+	+	+	+	+	+	+
Q25	$3,7 \times 10^7$	+	+	+	+	+	+	+
Q26	$1,5 \times 10^8$	+	+	+	+	+	+	+
Q27	$1,5 \times 10^6$	+	+	+	+	+	+	+
Q28	$1,1 \times 10^7$	+	+	+	+	+	+	+
Q29	$5,5 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+
Q30	$1,2 \times 10^8$	+	+	+	+	+	+	+
AMOSTRAS **FID**	CONTAGEM (UFC/g)	Catal.	Hemol.	Amil.	VP	NO_3/ NO_2	Motil.	Gelat
FI 7	$1,3 \times 10^5$	+	+	+	+	+	+	+
FI 8	$3,0 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+
FI 10	$1,7 \times 10^5$	+	+	+	+	+	+	+
FI 18	$8,0 \times 10^3$	+	+	+	+	+	+	+
FI 19	$1,1 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+

Provas Bioquímicas: Catal. (catalase); Hemo.(hemólise); Amil.(amilase); VP(Voges P.);NO_3/NO_2(redução de nitrato a nitrito); Motil. (motilidade); Gelat. (gelatinase).

NA tabela 8 avaliaram-se os resultados referentes ao crescimento do *Bacillus cereus* em queijo MF e FID, assim como as provas bioquímicas realizadas para sua identificação. Na legislação brasileira vigente não há padrão microbiológico para este microrganismo em queijo Minas Frescal (BRASIL,1996), contudo para alimentos infantis, incluindo a fórmula infantil estabelece o limite de $1x10^2$ UFC/g ou mL.

Diante deste padrão, constata-se que cinco das 30 amostras analisadas de FID estavam em não-conformidade com a RDC $n^0$12, representando 16,67% de alimentos impróprios ao consumo. Este resultado foi mais significativo na pesquisa de Reyes et al. (2007) que encontrou 45,9% das amostras analisadas contaminadas por *B. cereus*. Contudo outros autores apresentaram resultados diferentes Assunção (2008) avaliando a presença de microrganismos patogênicos em Fórmulas Infantis detectou 40% das amostras contaminadas por *B. cereus,* porém em quantidades inferiores a $1x10^2$ UFC/g de produto e uma das seis estirpes isoladas produtoras de toxina diarreica. Furtado et al. (2013) em 62 amostras analisadas constatou que todas estavam em níveis aceitáveis para o consumo, entretanto estirpes potencialmente toxigênicas foram isoladas. Não foram encontrados resultados na literatura referentes a contaminação de queijo Minas Frescal por *Bacillus cereus*. Conclui-se que a falta de padrão microbiológico para este microrganismo em queijo MF, representa uma falha no controle microbiológico deste alimento, pois nesta pesquisa o *B. cereus* foi isolado em todas as amostras de queijo.

Figura 26: Frequência dos alimentos em não conformidade com padrões fixados para contagens de *Bacillus cereus*



**** Não existe padrão microbiológico para ***Bacillus cereus*** em queijo Minas Frescal na legislação brasileira (RDC n°12)

Os resultados referentes ao comportamento das estirpes de *Bacillus cereus* isoladas em queijo Minas Frescal e Fórmulas Infantis Desidratadas perante aos antimicrobianos estão descritos na tabela 9.

TABELA 9: Comportamento das estirpes de *Bacillus cereus* isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) perante aos antimicrobianos.

ANTIMICROBIANO	COMPORTAMENTO DAS ESTIRPES de *Bacillus cereus* (12 estirpes: 7 MF/ 5 FID)		
	SENSÍVEL MF / FID	INTERMEDIÁRIO MF / FID	RESISTENTE MF / FID
CLINDAMICINA	2(28,6%) / 4(80%)	-------/ -------	5(71,4%) / 1(20%)
ERITROMICINA	2(28,6%) / 4(80%)	-------/ -------	5(71,4%) / 1(20%)
OXACICLINA	1(14,3%) / 2(40%)	-------/ -------	6(85,7%)/ 3(60%)
PENICILINA	1(14,3%) / -------	-------/ -------	6(85,7%)/ 5(100%)
TEICOPLAMINA	2(28,6%) / 2(40%)	-------/2(40%)	5(71,4%) / 1(20%)
VANCOMICINA	2(28,6%) / 2(40%)	-------/ -------	5(71,4%) / 3(60%)
AZTREONAM	------- / -------	-------/ -------	7(100%) / 5(100%)
CEFOXITINA	2(28,6%) / 3(60%)	-------/-------	5(71,4%) / 2(40%)
CEFTRIAXONA	1(14,3%) / -------	-------/ -------	6(85,7%) / 5(100%)
CLORANFENICOL	3(42,8%) / 4(80%)	-------/1(20%)	4(57,1%) / -------
GENTAMICINA	2(28,6%) /5(100%)	-------/ -------	5(71,4%) / -------
TETRACICLINA	2(28,6%) / 2(40%)	-------/3(60%)	5(71,4%) / -------

Ao analisar a tabela identifica-se que 100% das estirpes de *Bacillus cereus* isoladas das amostras de FID foram resistentes à penicilina (PEN), ao aztreonam (ATM) e à ceftriaxona (CRO), 60%, 40% e 20% resistentes à oxaciclina (OXA) e vancomicina (VAN); à cefoxitima (CFO) e aos antimicrobianos clindamicina (CLIN), eritromicina (ERI) e teicoplamina (TEC) respectivamente. Contudo, 100% das estirpes foram sensíveis à gentamicina (GEN), com relação aos outros antimicrobianos a sensibilidade variou entre 80%, 60% e 40% para a clindamicina (CLIN), eritromicina (ERI) e cloranfenicol (CLO); à cefoxitina; à oxaciclina (OXA), teicoplamina (TEC), vancomicina (VAN), e à tetraciclina (TET) respectivamente. Resultados condizentes com estes foram encontrados na pesquisa de Esper (2010) ao constatar que as estirpes de *B. cereus* isoladas eram também sensíveis à cefoxitna, eritromicina, gentamiciana tetraciclina e ao cloranfenicol, e resistentes à ceftriaxona.

Com relação às estirpes isoladas em amostras de queijo MF, 100% apresentaram-se resistentes ao aztreonam (ATM) aos demais antibióticos a resistência variou entre 57,1% a 85,7%. A sensibilidade variou entre 14,3% a 42,8%.

A multirresistência pode ser constatada (tabela 16) em 85,7% das estirpes isoladas em queijo MF e em 100% das estirpes isoladas nas Fórmulas Infantis.

5.5 *Cronobacter* spp.

Na tabela 10 observam-se os resultados da pesquisa de *Cronobacter* spp. em queijo Minas Frescal e Fórmulas Infantis Desidratadas incubados em temperaturas distintas (36 ± 1℃ e 44 ±0,5 ℃).

TABELA 10: Resultado do isolamento de *Cronobacter* spp. realizados em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID).

AMOSTRAS **MF**	Temperatura de isolamento (℃)	Presença de *Cronobacter* spp
Q1	36	Três estirpes
	44	Uma estirpe
Q4	36	Duas estirpes
	44	Sem crescimento
Q6	36	Quatro estirpes
	44	Três estirpes
Q7	36	Três estirpes
	44	Sem crescimento
Q8	36	Quatro estirpes
	44	Sem crescimento
Q10	36	Três estirpes
	44	Sem crescimento
Q11	36	Sem crescimento
	44	Três estirpes
Q13	36	Sem crescimento
	44	Duas estirpes
Q14	36	Sem crescimento
	44	Duas estirpes
Q15	36	Sem crescimento
	44	Cinco estirpes
Q16	36	Sem crescimento
	44	Três estirpes
Q17	36	Sem crescimento
	44	Três estirpes
Q19	36	Sem crescimento
	44	Duas estirpes
AMOSTRAS **FID**	Temperatura de isolamento	Presença de *Cronobacter* spp
FI 20	36	Duas estirpes
	44	Sem crescimento
FI 22	36	Quatro estirpes
	44	Quatro estirpes

A presença de *Cronobacter* spp. ocorreu em 43,33% (13) das amostras de queijo Minas Frescal analisadas. A presença de *Cronobacter* spp. foi evidenciada em duas das 30 amostras de Fórmulas Infantis analisadas, totalizando 6,67% de contaminação por este patógeno nas FDI.

Este resultado está condizente com os dados obtidos na FAO/WHO, quando informam que em estudos epidemiológicos foi verificada a relação entre a infecção e o consumo de Fórmulas Infantis, porém o nível de contaminação é baixo, entretanto considerado de alto risco.

Em 1988 Muytjens et. al, ao analisarem 141 amostras de FID provenientes de diversos países (35), isolaram *Cronobacter spp*. (*E. sakazakii)* em 14,1% das amostras e 52,2% de outras enterobactérias.

Outros autores encontraram resultados próximos, em 2004 Iversen et al. encontraram 2,44% de suas 82 amostras de FID contaminadas por *E. sakazakii.*

Contudo, Assunção (2008) percebeu em sua pesquisa a ausência deste microrganismo em todas as amostras por ele analisadas, fato que atribuiu à pequena dimensão da amostragem. Entretanto, Shaker et. al (2007), identificaram a *Cronobacter* spp. em 17, 4% das amostras de Fórmulas Infantis analisadas.

Outro dado interessante pode ser percebido relacionado com a temperatura de incubação, pois foram encontradas 43 estirpes de *Cronobacter* spp*.* em queijo MF e apenas 10 nas FID, das 43 estirpes, 12 (27,91%) cresceram apenas a 36 ± 1℃, 20 (46,51%) cresceram apenas a 44 ±0,5 ℃ e 11(25,59%) estirpes se desenvolveram em ambas temperaturas. Este fato também pode ser observado nas Fórmulas Infantis, pois das 10 estirpes encontradas, 2 (20%) cresceram apenas a 36 ± 1℃ e 8 (80%) em ambas temperaturas e nenhuma cresceu apenas a 44± 0,5℃.

Com a análise dos dados de crescimento bacteriano em função da temperatura de incubação observou-se um comportamento distinto da *Cronobacter* spp. quando incubada a 36 ± 1℃ ou a 44± 0,5℃. NA Tabela 10 co nsta o número de estirpes detectadas nas amostras de queijo MF e FID em cada temperatura de incubação. Ao todo foram identificadas 13 amostras de QMF com a presença de estirpes de *Cronobacter* spp., enquanto para as amostras de FID foram apenas duas.

Ressalta-se que das 13 amostras onde estirpes de *Cronobacter* spp. foram identificadas, apenas em uma amostra a detecção foi simultânea para as duas temperaturas, enquanto foi identificada a presença de *Cronobacter* spp. em seis amostras incubadas a 36 ± 1℃ e em oito amostras in cubadas a 44± 0,5℃.

NA análise de correspondência observou-se a correlação negativa (-0,20343) entre as duas temperaturas. Isto pode ser um indicativo de que existam estirpes de *Cronobacter*spp. que se desenvolvam melhor em uma temperatura à outra, tornando a questão da temperatura de incubação um assunto crucial que deve ser considerado nas metodologias para detecção deste microrganismo. Em função do baixo número de amostras não foi realizada a análise de correlação em FID, mas em uma amostra esta bactéria foi detectada nas duas temperaturas de incubação enquanto em outra amostra, apenas houve presença à temperatura de 36 ± 1℃. Desta forma, em função destes resultados, pode-se sugerir que o uso de duas temperaturas de incubação pode aumentar de seis para 13 amostras positivas, o que representa um aumento de 116% na taxa de detecção. Em função da correlação negativa, não se pode sugerir uma única temperatura como mais eficaz na detecção da bactéria.

Em sua pesquisa, Assunção (2008) verificou que a recuperação dos microrganismos no meio ESIA era menor em relação a outros meios utilizados (DFI e Chromocult) e que este acontecimento poderia estar relacionado com a temperatura de incubação. Então procedeu ao isolamento utilizando o mesmo meio, porém a 37℃. Constatou que a recuperação foi muito mais significativa e semelhante aos outros meios utilizados. Do mesmo modo, Warken (2010) apontou a temperatura de 44 ℃ como um fator limitante à multiplicação da *Cronobacter* spp., uma vez que estas poderiam não ser detectadas em análise microbiológica de rotina, tornando se um risco para a qualidade do alimento. Sugerindo que as novas propostas para isolamento desta bactéria considerem o possível efeito inibitório da temperatura sobre sua multiplicação.

Estes dados permitem inferir que a prevalência da *Cronobacter* spp. em Fórmulas Infantis Desidratadas é baixa, contudo, mesmo estando nesta magnitude o risco deve ser considerado, uma vez que há o favorecimento da proliferação desta bactéria durante e após sua reconstituição até o consumo final (FAO/WHO, 2004).

Pensando nesta baixa prevalência em FID buscou-se isolar este microrganismo em um alimento proveniente da mesma matéria prima, porém fabricado sob intensa manipulação com a intensão de intensificar este isolamento, tendo como referência inúmeros dados na literatura sobre a elevada contaminação do queijo Minas Frescal por diversos microrganismos. Com isso, os resultados obtidos permitiram observar com maior propriedade, pois foram isoladas quatro vezes mais estirpes em queijo MF(43) do que na FID (10), que a temperatura pode sim ser o fator inibitório para a multiplicação da *Cronobacter* spp. Contudo, cabe lembrar que algumas estirpes tanto em queijo MF, quanto na FID desenvolveram-se apenas na temperatura de 36 ± 1℃, outras apenas na temperatura de 44℃± 0,5℃, concluindo-se que as duas temperaturas no processo de isolamento devem ser consideradas.

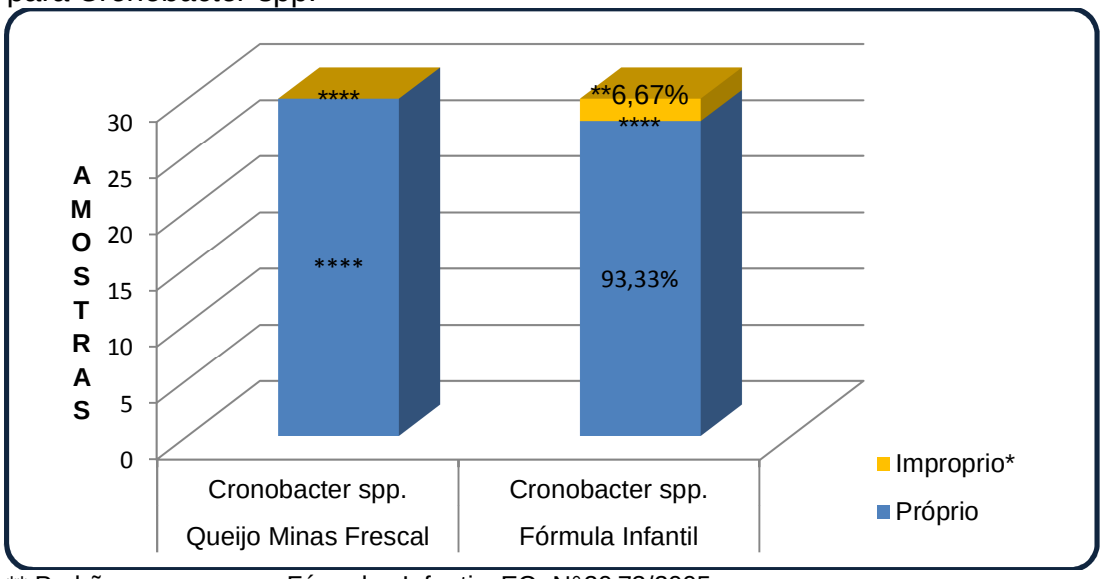
TABELA 11: Resultado das Provas Bioquímicas* para *Cronobacter* spp. realizadas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID).

	PROVAS BIOQUÍMICAS															
QMF	ONPG	ADH	LCD	ODC	H_2S	URE	VP	PD	IND	CIT	MAL	ADO	ARA	SOR	SAC	RAF
Q1	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Q4	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Q6	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Q7	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Q8	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Q10	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Q11	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Q13	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Q14	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Q15	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Q16	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Q17	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Q19	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
FID	ONPG	ADH	LCD	ODC	H_2S	URE	VP	PD	IND	CIT	MAL	ADO	ARA	SOR	SAC	RAF
FI 20	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
FI 22	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+

* Galeria Bactray I e II

As estirpes de Cronobacter isoladas das amostras de queijo Minas Frescal e das Fórmulas Infantis possuíam características bioquímicas (Tabela 11) positivas para as provas do O-Nitrofenol-beta-d-Galacto-Piranoside(ONPG), dehidrolase (ADH), ornitina descarboxilase (ODC), VogesProskauer (VP), fenilalanina desaminase (PD), citrato (CIT), arabinose (ARA), sacarose (SAC) e rafinose (RAF) e características bioquímicas negativas para as provas do sulfeto de hidrogênio (H2S), uréia (URE), indol (IND), malonato (MAL), adonitol (ADO). Estes resultados são condizentes com os descritos por Richard (1984) para confirmação bioquímica da Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii) representados na tabela 18 (Apêndices).

Figura 27: Frequência dos alimentos em não conformidade com padrões fixados para *Cronobacter* spp.



** Padrão europeu para Fórmulas Infantis: EC- N°20 73/2005
**** Não existe padrão microbiológico para *Cronobacter* spp em queijo Minas Frescal e FID na legislação brasileira (RDC n°12)

Os resultados referentes ao comportamento das estirpes de *Cronobacter* spp isoladas em queijo Minas Frescal e Fórmulas Infantis Desidratadas perante aos antimicrobianos estão descritos na tabela 12.

TABELA 12: Comportamento das estirpes de *Cronobacter* spp Isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) perante aos antimicrobianos

ANTIMICROBIANO	COMPORTAMENTO DAS ESTIRPES DE *Cronobacter* spp (23 estirpes: 13 MF/ 10 FID)		
	SENSÍVEL MF / FID	INTERMEDIÁRIO MF / FID	RESISTENTE MF / FID
AMICACINA	11(84,6%) / 10(100%)	1(7,7%) / -------	1(7,7%) / -------
AMPICILINA	5(38,5%) / 10(100%)	2(15,4%) / -------	6(46,1%) / -------
CEFALOTINA	4(30,8%) / 3(30%)	---------- / -------	9(69,2%) / 7(70%)
CEFOTAXIMA	1(7,7%) / 1(10%)	5(38,5%) / 9(90%)	7(53,8%) / -------
CEFTAZIDINA	4(30,8%) / 10(100%)	1(7,7%) / -------	8(61,5%) / -------
SULFAZOTRIM	9(69,2%) / 8(80%)	1(7,7%) / -------	3(23,1%) / 2(20%)
AZTREONAM	3(23,1%) / 8(80%)	---------- / 1(10%)	10(76,9%) / 1(10%)
CEFOXITINA	6(46,1%) / 9(90%)	---------- / -------	7(53,8%) / 1(10%)
CEFTRIAXONA	7(53,8%) / 7(70%)	1(7,7%) / -------	5(38,5%) / 3(30%)
CLORANFENICOL	9(69,2%) / 10(100%)	---------- / -------	4(30,8%) / -------
GENTAMICINA	7(53,8%) / 8(80%)	3(23,1%) / -------	3(23,1%) / 1(10%)
TETRACICLINA	6(46,1%) / 10(100%)	2(15,4%) / -------	5(38,5%) / -------

Os dados permitem observar um comportamento mais sensível da *Cronobacter* spp aos antimicrobianos com relação às demais bactérias pesquisadas. Constata-se que 100% das estirpes foram sensíveis à amicacina, ampicilina, ceftazidina, cloranfenicol e à tetraciclina. 90% apresentaram sensibilidade à cefoxitina, 80% ao sulfazotrin, ao aztreonam e à gentamicina, 70% à ceftriaxona. Quanto resistência, a cefalotina foi menos eficiente, pois 70% das estirpes foram resistentes. Observou-se ainda um valor intermediário de resistência à cefotaxima (90%). A resistência à cefalotina também foi informada por Warnken (2010) em 96,3% das cepas estudadas, contudo os resultados divergiram em relação à cefoxitina e à ampicilina, nesta pesquisa 90 e 100% das estirpes foram susceptíveis à estes antimicrobianos respectivamente, para o autor, as estirpes foram resistentes à cefoxitina (63%) e também à ampicilina (70,4%). O caráter multirresistente também pode ser observado para algumas estirpes encontradas, assim como Warnken (2010) observou nas estirpes de FID analisadas, consideradas positivas para vários marcadores de virulência e resistentes a diferentes antimicrobianos

Da mesma forma, as estirpes de *Cronobacter* spp. provenientes das amostras de queijo MF possuíram um caráter um pouco mais sensível às demais bactérias já

analisadas. Destas 84,6% foram sensíveis à ação da amicacina, 69,2% ao cloranfenicol e ao sulfazotrim, 53,8% à ceftriaxona e à gentamicina. O aztreonam foi o antimicrobiano menos eficiente em Foram resistentes em 76,9% das estirpes. Para os demais antimicrobianos a resistência variou entre 7,7% a 69,2%. A multirresistência pode ser verificada em 40% das estirpes isoladas em FID e em 92,3% das estirpes em queijo Minas Frescal.

Os dados de suscetibilidade aos antimicrobianos são compatíveis aos apresentados no “Centers for Desease Control and Prevention” (CDC, 2009) ao apresentarem os resultados de sensibilidade antimicrobiana de estirpes isoladas em crianças no Novo México, estas também foram sensíveis à ceftriaxona e gentamicina, além da ciprofloxacina e o sulfatrimetoprim.

Outra constatação importante, relacionada ao potencial resistente das estirpes isoladas em queijo MF e em FID, pode ser observada nas tabelas 13,14,15,16 e 17 (APÊNDICES). Na tabela 13 pode-se inferir que dos casos de resistência envolvendo a

E. coli, 54,8% ocorreram com as estirpes isoladas de queijo MF e 30,5% ocorreram com as estirpes isoladas das Fórmulas Infantis. Na tabela 14 observam-se os dados referentes ao comportamento das estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva, onde. 75,31% dos casos de resistência ocorreram com as estirpes isoladas de queijo MF e 33,3% ocorreram com as estirpes isoladas das Fórmulas Infantis. Do mesmo modo, verifica-se na tabela 15 que 50% dos casos de resistência envolvendo a *Salmonella* spp., ocorreram com as estirpes isoladas de queijo MF e 22,2% ocorreram com as estirpes isoladas das Fórmulas Infantis. Na tabela 16, sobre o comportamento resistente das estirpes de *Bacillus cereus,* observou-se que 76,2% dos dados de resistência ocorreram com as estirpes isoladas de queijo MF e 43,3% com as estirpes isoladas em FID.

Na tabela 17, sobre o comportamento resistente das estirpes de *Cronobacter* spp. verifica-se que 43,6% dos dados de resistência ocorreram com as estirpes isoladas de queijo MF e apenas 12,5% ocorreram com as estirpes isoladas em FID. Percebe-se que, em todos os casos expostos, as estirpes que sobreviveram ao processo de fabricação das Fórmulas Infantis Desidratadas são mais sensíveis aos antimicrobianos (Figuras, 26 a 30) quando comparadas às estirpes que sobreviveram

ao processo de fabricação do queijo Minas Frescal. Fato que, possivelmente, possa estar relacionado aos processos tecnológicos de cada produto lácteo em questão. Conforme exposto anteriormente, no processo tecnológico das Fórmulas Infantis Desidratadas é prevista a atomização dos ingredientes com temperatura variando entre 130 - 200℃. Esta etapa, apesar de não ser realizad a com o objetivo higiênico-sanitário, para eliminação dos microrganismos patogênicos, parece influenciar neste resultado. Entretanto a intensa manipulação do queijo MF após a pasteurização do leite pode determinar o aparecimento de estirpes menos injuriadas, consequentemente mais resistentes.

Os resultados apresentados nesta pesquisa servem para colaborar com a indústria de alimentos e medicamentos, pois adverte sobre os agravos que um alimento contaminado pode acarretar aos consumidores e aos estabelecimentos pelos prejuízos financeiros decorrentes da diminuição do prazo comercial do produto a ser comercializado, fornece dados relevantes sobre sensibilidade das bactérias isoladas em produtos lácteos frente aos antimicrobianos comumente utilizados.

6 CONCLUSÕES

Os resultados da avaliação da qualidade microbiológica confirmam que as amostras de Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) não são produtos estéreis, pois foram isolados microrganismos que podem colocar em riscos a saúde de consumidores infantis.

Com relação aos S*taphylococcus* coagulase positiva, sua presença foi confirmada tanto nas amostras de queijo Minas Frescal (MF) como nas amostras de Fórmula Infantil Desidratada (FID) acima dos valores preconizados pela legislação, indicando falhas higiênico-sanitárias no processamento destes produtos.

A presença de *E. coli* também foi confirmada nas amostras de queijo MF e de FID sendo confirmados os sorotipos O158 e O114, representando uma possível contaminação por outras enterobactérias potencialmente patogênicas.

O isolamento de *Bacillus cereus*, foi bastante significativo nas amostras de queijo MF, apesar de não existir padrão microbiológico na legislação brasileira para este patógeno em queijos, constatou-se que a contaminação existe, consequentemente, o risco de causar doença é seguramente questionável.

A presença de *Salmonella* spp. foi confirmada tanto nas amostras de queijo Minas Frescal quanto nas amostras de Fórmulas Infantis Desidratadas indicando falhas higiênico-sanitárias e tecnológicas nos processos de fabricação, pois o risco da sua presença poderia ser eliminado facilmente com o uso correto do binômio tempo x temperatura e medidas preventivas para contaminação pós-processamento térmico.

A validação da metodologia utilizada para isolamento de *Cronobacter* spp. não está no escopo deste trabalho, portanto sugere-se que outras pesquisas, relacionadas ao contexto, sejam realizadas com este intuito.

No estudo da *Cronobacter* em queijo Minas Frescal observaram-se dados importantes com relação à temperatura de incubação deste microrganismo, e sugere-se que sejam utilizadas duas temperaturas, simultaneamente a 36 ± 1℃ e a 44 ± 0,5℃, para a técnica de isolamento.

A avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos foi fundamental para mostrar mais um aspecto diferencial desta pesquisa, devido à observação do comportamento

mais sensível das estirpes isoladas em Fórmulas Infantis Desidratas (FID) quando comparadas às isoladas em queijo Minas Frescal (MF), fato que foi observado em todos os microrganismos analisados.

Considerando-se os resultados obtidos nesta pesquisa destaca-se a importância das medidas de prevenção à contaminação dos alimentos, principalmente aqueles destinados ao público infantil e aos imunossuprimidos, por serem mais suscetíveis aos riscos causados por agentes patogênicos veiculados pelos alimentos.

7 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABREU, S.A; TEIXEIRA, J.C.A. *Apresentação de Trabalhos Monográficos de Conclusão de Curso.*Editora da UFF, 8.ed. Niterói, 2005. 89p.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermidades transmisibles comunes al hombre y a los animales.* Organização Pan Americana de la Salud (OPS). Washington, EUA. *Puplicacion Científica y Técnica* n°580. 3ª ed. v.1. 2001. 398p.

ALVES, V.O. *Avaliação higiênico-sanitária de amostras de queijos minas frescal artesanais comercializados em feiras livres da cidade de Volta Redonda-RJ e suscetibilidade antimicrobiana das estirpes patogênicas isoladas*. Dissertação de Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal. Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense. Niterói, Rio de Janeiro, 2013, 134p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 16ªed., Washington: American Public Health Association, 1985, 385p.

ANDRADE, N.J. de; SILVA, R.M.M. da; BRABES, K.C.S. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. *Ciência e Agrotecnologia*, v.27, n.3, p.590-596, mai./jun., 2003.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; ROSADO, M. S. *Controle da higienização na indústria de alimentos.* In: ANDRADE, N. J. Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo. Varela. 2008. 410p,

ARSALAN, A.; ANWAR, Z.; AHAMED, I.; SHAD, Z.; AHAMED, S. *Cronobacter sakazakii:* An emerging contaminant in pediatric infant milk formula. *International Research Jounal of Phamacy*. v.4, n.4. 2013.

ASSUNÇÃO, R.M.A. *Enterobacter sakazakii em fórmulas lácteas infantis em pó: implementação da metodologia de detecção e avaliação microbiológica de amostras comercializadas no distrito de Lisboa*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2008, 104p.

BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; CORRÊA, A.; FERREIRA, A.J.P.; CALDERARO, F.F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de Leitões com diarréia. *Arquivos do Instituto Biológico*. v.69, n.2, p.15-18, 2002.

BARREIRA, E. R.; SOUZA, D. C.; GÓIS, P. F.; FERNANDES, J. C. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascidos: *relato de caso*. *Pediatria*. v.25 n.1/2, p.65-70, 2003.

BARRETO, N.S.E.; SANTOS, G.C.F.; CREPALDI, A.L.; SANTOS, R.A.R. Qualidade microbiológica e suscetibilidade antimicrobiana do leite *in natura* comercializado em Cruz das Almas, Bahia. *Ciências Agrárias*. Londrina, v.33, n.6, p.2315-2326, nov/dez. 2012.

BAUER, A.W.; KIRB, W.M.M; SCHERRIS, J.C; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology*, v.45, n.4, p.310-315, 1966.

BOS, R.; VAN DER MEI, H.C.; MEINDERS, J.M.; BUSSCHER, H.J. A quantitative method to study co-adhesion of microorganisms in a parallel plate-flow chamber – *basic principles ofthe analysis*. *Journal of Microbiology Methods*, v. 20.p.289–305, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Portaria nº 352, de 04/09/97. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 1997.

_____. _____. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa SDA n°62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2003.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Uso Racional de Medicamentos. *Série A. Normas e Manuais Técnicos*. Brasília, DF, 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/uso_racional_medicamentos_temas_selecionados.pdf.> Acessado em: 24 Nov 2013.

_____. Decreto-Lei n º 467, de 13 de fevereiro de 1969, que dispõe sobre a Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário, dos Estabelecimentos que os Fabriquem e dá outras Providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 1969.

_____. Ministério da Saúde. Resolução - RCD Nº 63, de 6 de julho de 2000. Regulamento técnico para a terapia de nutrição enteral*. Diário Oficial da União*, Brasília, DF; 2000.

_____. Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004, que aprova o Regulamento de Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário e dos Estabelecimentos que os Fabriquem ou Comerciem, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2004.

_____. Lei nº 11.265, de 3 de janeiro de 2006. Regulamenta a comercialização de alimentos para lactentes e crianças de primeira infância e também a de produtos de puericultura correlatos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I eII. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2001.

_____. _____. Perguntas frequentes sobre fórmulas infantis. 2009.Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/780ce6804a982fa19276d64600696f00/Formulas_Infantis_perguntas.pdf?MOD=AJPERES> Acessado em 13 Ago 2013.

_____. Ministério da Saúde. Portaria n°1428 de 26 de Novembro de 1993. Regulamento técnico para inspeção de alimentos, as diretrizes para o estabelecimento de boas práticas de produção e prestação de serviços na área de alimentos e o regulamento técnico para o estabelecimento de padrões de identidade e qualidade para produtos na área de alimentos. *Diário Oficial república Federativa do Brasil*, Brasília, DF, n°229, p.18415-18419, 02 de dezembro de 1993d. Seção 1.

_____. _____. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158 p.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 44, de 26 de outubro de 2010, que dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 28 de outubro de 2010.

_____. _____. Resolução - RDC Nº 17, de 15 de abril de 2011, que altera a RDC nº 44 de 26 de outubro de 2010, que dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 18 de abril de 2011.

_____. _____. Resolução - RDC nº. 42, de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico de compostos de nutrientes para alimentos destinados a lactentes e a crianças de primeira infância. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 21 set. 2011.

_____._____. Resolução - RDC nº. 43, de 19 de setembro de 2011. Regulamento Técnico para Fórmulas Infantis para Lactentes. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 21 set. 2011.

_____._____. Resolução - RDC nº. 44, de 19 de setembro de 2011. Regulamento Técnico para Fórmulas Infantis de Seguimento para Lactentes e Crianças de Primeira Infância. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 21 set. 2011.

_____. _____. Resolução - RDC nº. 45, de 19 de setembro de 2011. Regulamento Técnico para Fórmulas Infantis para Lactentes Destinadas a Necessidades Dietoterápicas Específicas e Fórmulas Infantis de Seguimento para Lactentes e Crianças de Primeira Infância Destinadas a Necessidades Dietoterápicas Específicas. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 21 set. 2011.

_____._____. Resolução - RDC nº. 46, de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia para fórmulas infantis destinadas a lactentes e crianças de primeira infância. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 21 set. 2011.

_____. Portaria nº 185, de 13 de Maio de 1997. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe fresco (inteiro e eviscerado). *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 1997.

BRENNER, D.J.; FARMER III, J.J. Family I. Enterobacteriaceae. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T.; *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, New York: Springer Science Business Media Inc., 2.ed, v.2. p.587-607, 2005.

CALDERÓN, G.R; DELGADO, P.A.M; URBANO, M.F.C.; COY, F.A.C. Resistência da *Salmonella* aos antimicrobianos convencionais para seu tratamento. *Revista CES Medicina Veterinária y Zootecnia.* Colombia, v.7, n.1, 2012.

CAMPOS, M. R. H.; KIPNIS, A. ANDRÉ, M. C. D. P. B.; VIEIRA, C. A. S.; JAYME, L. B.; SANTOS, P. P.; SERAFINI, A. B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas *de Escherichia coli* isoladas de manipuladores de leite cru e de queijo minas frescal em um laticínio de Goiás, Brasil. *Ciência Rural*, v. 36, n. 4, p. 1221-1227, 2006.

CAWTHORN, D.M.; BOTHA, S.; WITTHUHN, R.S. Avaliação de diferentes métodos para a detecção e identificação de *Enterobacter sakazakii* isoladas de leite de fórmula infantil Sul-Africano e do ambiente de processamento. *International Journal of Food Microbiology*, v.127, p.129-138. 2008.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Foodborne Disease outbreaks- United States, 2009-2010.*Morbidity Weekley Report.* v. 62, nº3, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco difusão: norma aprovada*. 8. ed. v. 23, 2003.

COMISSION REGULATION – EC N^{o} 2073/2005 of 15 November 2005. On microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union.* ISSN 1725-2555. L 338,v.48, 22 Dec. 2005.

DAVEY, M. E.; O`TOOLE, G.A. *Microbiology biofilms*: from ecology to molecular genetics. *Microbiology Molecular Review,* v.64, n.4, p.847-867, 2000.

DIAS, M. T. BRICIO, S.M.L.; ALMEIDA, D.; OLIVEIRA, L.A.T.; FILIPPIS, I. de; MARIN, V.A.. Caracterização molecular e avaliação de susceptibilidade antimicrobiana de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) isoladas de queijo minas macio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* , Campinas, v 32, n.4, dezembro de 2012.

DIONIZIO, F. L.; VALLE, R.H.P.; MARQUES, S.C.; MENDONÇA, A.T.; BOARI, C.A.; FREITAS, R.F. Presença de *Salmonella* sp. em queijos Minas Frescal e requeijão em barras produzidos artesanalmente na região de Salinas, Norte de Minas Gerais. CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS; CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 7, 2003, Belo Horizonte. **Anais**. São Paulo, 2003.

DI PRIMIO, E.M. *Qualificação e perfil de sensibilidade e resistência antimicrobiana de patógenos isolados em linhas de produção de alimentos de um hospital*. Dissertação de Mestrado em Nutrição e Alimentos. Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2012.

DOMING, K.J.; MAYER, H.K.; KNEIFEL, W. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. Media for isolation and enumeration. *International Journal of Food Microbiology*. v. 88, p. 147-164, 2003.

EL-SHAROUD, W. M.; SHAKE, R.R.; AL-HADDAQ, M.S.; AL-NABULSI, A.A.; HOLLEY, R.A. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. *BMC Microbiology*, v.9, p.24-33, 2009.

ESPER, L.M.R. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus*: *Quorum sensing, formação de biofilme e ação de sanitizantes*. Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010. 103p.

EWING, W.H. Edward's; Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. *Elsevier Science Publishers*. New York, cap. 6, p. 93-134, 1986.

European Commission. Directorate-General for Health and Consumers. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF*). Annual Report*, 2010. 64f.

European Commission. Directorate-General for Health and Consumers. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). *Annual Report*, 2011. 52f.

European Commission. Directorate-General for Health and Consumers. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). *Annual Report*, 2012. 60f.

EUZÉBY, J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: *a folder available on the Internet*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. V.47, p.590-592. 1997.* Disponível em: http://www.bacterio.net/staphylococcus.html. Acessado em: 18, set, 2013.

FAKRUDDIN, Md.; RAHAMAN, Md.M.; AHMED, M.M.; HOQUE, Md.M. *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*): An Emerging Foodborne Pathogen. *International Journal of Biomedical And Advance Research*. v.4, n.6, 2013.

FAO/WHO.Food and Agriculture Organization/ World Health Organization.*Joint FAO/WHO Workshop on Enterobacter sakazakii, and other microorganisms in powdered infant formula*. Food and Agriculture Organization/ World Health Organization, 2004.Disponível em: <http:/www.who.int/foodsafety/micro/meetings/feb2004/en>. Acessado em: 10 set. 2012

FAO/WHO.Food and Agriculture Organization/ World Health Organization. *Enterobacter sakazakii and Salmonella in powdered infant formula*: Meeting Report, Microbiological Risk Assessment Series 10, 2006.

FAO/WHO.Food and Agriculture Organization/ World Health Organization.*Joint FAO/WHO Workshop on Microbiological Risk Assessment series .Enterobacter sakazakii (Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae, 2008.Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jemra/mra15_sakazaki.pdf>. Acessado em: 2 Jan.13.

FAO/WHO Food Standard.*Codex Alimentarius Official Standards*. CAC/RCP 1 - 1969. General Principles of Food Hygiene. Revisada em 2003. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of standards/en/?provide=standards&orderField=fullReference&sort=asc&num1=CAC/RCP> Acessado em: 20 Jan 2013.

FAO/WHO Food Standard.*Codex Alimentarius Official Standards*. CODEX STAN 72 – 1981. Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children. Revisado em 2011. Disponível em: < http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/?provide=standards&orderField=fullReference&sort=asc&num1=CODEX> Acessado em : 9 Ago. 2012.

FAO/WHO Food Standard.*Codex Alimentarius Official Standards*. List CAC/RCP 66-2008.Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children. Disponível em:
Standard for Infant Formula and Formulas for Special Medical Purposes Intended for Infants

FARBER, J. M. *Enterobacter sakazakii* – new foods for thought? *The Lancet*, v.363, p. 5-6, 2004.

FARMER, J.J III, ASBURY, M.A.; HICKMAN, F.W.; BRENNER, D.J. *Enterobacter sakazakii* : A new species of " Enterobacteriaceae " isolated from clinical specimens. *International.Journal of Systemic Bacteriology*. V.30, n.3, p.569-584. 1980.

U.S. Food and Drug Administration. Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. *Bad Bug Book*. 2012. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/food/foodborneillnesscontaminants/ucm297627.pdf> Acessado em: 24 Fev 2013.

FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T. Pesquisa de *Salmonella* sp.,*Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.23, p.162-165, 2003.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da segurança alimentar*. 7ªed. Porto Alegre: Artmed, 2013, 429p.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. *Acta Scientia e Veterinariae*, v.33, n.3, p.291-296, 2005.

FRANCO, B.D.G.M.;LANDGRAF,M. *Microbiologia de Alimentos*, São Paulo. Atheneu. 2001.192p.

FRANCO, R.M. *Escherichia coli: "Ocorrência em suínos abatidos do Grande Rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal, tipo toscana."*2002. 153p. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária na área de concentração e Higiene Veterinária e Processamento Tecnológicos de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2002.

FRANCO, R,M. *Agentes etiológicos de doenças alimentares*. Coleção didáticos. Niterói. Editora da UFF. 2012. 120 p.

FOOD AND DRUG ADIMINISTRATION/CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION. *Isolation and Enumeration of Enterobacter sakazakii from Dehydrated Powdered Infant Formula*. July 2002; Revisado em Ago 2002. Disponível em: http://cfsan.fola.gov/~comm/mmesakaz.html**.** Acessado em 20 mar. 2012.

FURTADO, R.; CORREIA, C.B.; ALVITO, P. *Contaminantes de origem microbiológica em alimentação infantil*. Departamento de Alimentação e Nutrição. Instituto Nacional da Saúde. Lisboa. N.6, 2ª série. 2013

FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P. de M. *Tecnologia de queijos*. Manual técnico para a produção industrial de queijos. São Paulo, Dipemar, 1994. 105 p.

GARDINI, F.; MARTUSCELLI, M.; CARUSO, M. C.; GALGANO, F.; CRUDELE, M.A.; FAVATI, F.; GUERZONI, M.E.; SUZZI, G. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. N.64, p.105 –117, 2001.

GILLIO, C. de M. *Enterobacter sakazakii em fórmulas lácteas infantis desidratadas, para bebês de 0-6meses. 2006*. Dissertação de Mestrado em Bromatologia - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-07032007-104637/>. Acessado em: 27 Jan 2013.

GILT-SETAS A, RAMOS A, MARTIN C, URTIAGA M, INZA, M.E. Salmonelosis no tifoidea en un área de salud de Navarra, España. *Revista Española de Salud Pública*, Madrid; v.76, n.1, p.49-56. 2002.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. da S.; PUPO, M. T. *Antibióticos*: Importância Terapêutica e Perspectivas para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. *Quimica Nova*, v. 33, n.3, p. 667-679. Ribeirão Preto – SP, Brasil, 2010.

GUNDUZ, G. T.; TUNCEL, G. Biofilm formation in an ice cream plant.*Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 89, p. 329-336, 2006.

GURTLER, J.B., KORNACKI, J.L., BEUCHAT, L.R. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health*. International Journal of Food Microbiology*, v.104, p.1-34. 2005.

INTERNATIONAL BABY FOOD ACTION NETWORK (IBFAN). *Product Recall List* (2012). Disponível em : <http://www.ibfan.org/art/recalls_2010-2012-feb.pdf.> Acessado em: 13 Ago 2013.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF.). *APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos*. São Paulo: Varela, 1997. 377 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARTIZATION.*ISO/TS* 22964:2006(E). *Milk and Milk products – Detection of Enterobacter sakazakii.* 2006.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant formula. *Trends in Food Science and Technology*, v.14,p. 443-454, 2003.

IVERSEN, C.; WADDINGTON, M.; On S.L.W.; FORSYTHE, S. Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology*,v.42, p.5368 5370, 2004.

JAY, J. M. *Microbiologia moderna dos alimentos.*4ª ed., Zaragoza. Acribia, 1992. 804p.

JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos.*6ª ed., Artmed, Porto Alegre, 2005.711p.

JOKER, R.N. NORHOLM, T.; SIBONI, K.E. A case of neonatal meningitis caused by a yellow Enterobacter. *Dan. Med. Bull*. v.12, p.128-130.1965.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from foods and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology,* v.88, p 123-131, 2003.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. *Diagnóstico Microbiológico* – Texto e Atlas Colorido. 5ª.ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.

MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T. DE OLIVEIRA; SANTOS, E. B.; GOUVÊA, R.. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp. Isoladas de carne moída bovina. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v 45, n.2, p 116-121, 2008.

MERCK, 2000, modificado por: FRANCO, R. M.; LEITE, A. M. O. Enumeração e identificação de *Enterococcus* spp. e cepas de *Escherichia coli* patogênico em coxas de frango e estudo de atividade antimicrobiana das cepas isoladas. In: XV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PREMIO UFF VASCONCELOS TORRES DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA,2005, Niterói. *Anais*. Niterói, 2005.CD – ROM.

MUYTJENS, H.L.; ROELOFS, W.H.; JASPAR, G.H.J. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriacea. *Journal of Clinical Microbiology,* n.26, p.743-746. 1988.

NATARO J. P.; BALDINI, KAPER, J.B.; BACK, R.E.; BRAVO, N.; LEVINE, M.M. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. *The Journal Infectious Disease*, v.152, p.560-565, 1985.

NAZAROWEC-WHITE, M.; FARBER, J. M. Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Journal of Food Protection*, v.60, p.226-230, 1997.

OKURA, M.H. *Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas Frescal comercializados na região do Triângulo Mineiro*. Tese de Doutorado em Microbiologia. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal. 128f. 2010.

OSAILI, T.M.; SHAKER, R.R.; AL-HADDAQ, M.S.; AL-NABULSI,A.A.; HOLLEY, R.A. Heat resistance of(CAC / RCP 1-1969), *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in milk and special feeding formula*. Journal of Applied Microbiology.* v.107, p. 928-935 , 2009.

Pan American Foot-and-Mouth Disease Center of the Pan American Health Organization (RIMSA 16). *16th Meeting, at the Ministerial Level, on Health and Agriculture;* 26-27 July 2012; Santiago, Chile. Rio de Janeiro (Brazil): PAHO/PANAFTOSA; 2012; Acessado em: 23 Jan 2013. Disponível em: <http://ww2.panaftosa.org.br/rimsa16/index.php?lang=en>

PERRY, K. S. *Queijo*: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. Minas Gerais. Química Nova. v. 27, n.2, p. 293-300. 2004

PICOLI, S. U.; BESSA, M.C.; CASTAGNA, S.M.F.; GOTTARDI, C.P.J.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. Quantificação de coliformes*, Staphylococcus* aureus e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v. 26, n.1, p. 64-69, jan./mar. 2006.

PINTO, F. G. S.; SOUZA, M.; SALING, S.; MOURA, A. C. Qualidade microbiológica de queijos minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. *Arquivo Instituto Biológico*, v.78, n.2, p. 191-198, 2011.

REYES,J.E., BASTIAS, J.M., GUTIERREZ,M.R., RODRIGUEZ,M.O. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. *Food Microbiology*, v.24, nº1, p.1-6,2007.

RIBEIRO, N.F. Resistência bacteriana aos antibióticos. In FERNANDES, A. T.; FERNANDES, M. O. V.; RIBEIRO, N. F. *Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde*. São Paulo, Atheneu, 2000.

RICHARD, C. Genus VI Enterobacter. In GARRITY, G. M., BOONE, D. R., CASTENHOLZ, R. W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. p. 465-469. Baltimore, 1984.

ROCHA, J. S.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. *Arquivos. Brasileiro de Mededicina Veterinária e Zootecnia.* v.58 n.2 . Belo Horizonte, 2006.

ROWLANDS, R. E. G. Resistência térmica de *Salmonella Enteritidis*, *S. Panama* e *S.Infantis* em fórmula láctea infantil reconstituída. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. p.36-39, 2006.

SALOTTI, B.M.; CARVALHO, A.C.F.B.; AMARAL, L.A.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; CORTEZ, A.L.; Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. São Paulo: abr./jun., 2006. *Arquivos do Instituto Biológico*,v.73, n.2, p. 171-175, Abr./Jun., 2006.

SHAKER, R.; OSAILI, T.; AL-OMARY, W.; JARADAT, Z.; AL-ZUBY, M. Isolation of *Enterobacter* sp. from food and food production environments. *Food Control*. N.8, p.1241–1245. 2007.

SILVA JÚNIOR, E. A. da. *Manual do Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação*. São Paulo: Livraria Varela. 1995

SILVA, W.P., GANDRA, E.A. *Estafilococos* coagulase positiva: Patógenos de importância em alimentos. *Revista Higiene Alimentar*, 2002.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S. dos; GOMES, R.A.R. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 3 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552p.

SILVA JÚNIOR. E. A. da. Manual de Controle Higiênico Sanitário em Alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 6ªed. , 2007.

SILVA, L.A.V. *Staphylococcus coagulase positiva em queijo Minas Frescal*. Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária na área de concentração e Higiene Veterinária e Processamento Tecnológicos de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2008.

SPREER, E*. Lactologia industrial*. 2ª ed. Zaragoza, Acribia, 1991.

SWANSON, K. M. J.; PETRAN, R. L.; HANLIN, J. H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4ª. Ed. Washington: APHA, cap.6, p.53-62. 2001.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: Resistência do estafilococo, do enterococo e do penumococco aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade. Brasileira de Medicina Tropical*. v.33, n.3, p.281-301, 2000.

TRABULSI, L.R ; TOLEDO, M.R.F. *Escherichia* . In: TRABULSI, L.R. *Microbiologia*. 2ªed. Rio de Janeiro, São Paulo: Atheneu, 1989ª. 386p. cap.26, p.149-155.

TRABULSI, L.R. Microbiologia. Editora Atheneu, 5ª ed., São Paulo, 2008, 760p.

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. EPM modificação do meio Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H_2S, uréase e triptofanodesaminase. *Revista de Microbiologia,* v.13, p.309-315, 1982_a.

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. MILI um meio para realização dos testes de mobilidade, indol e lisina descarboxilase. *Revista de Microbiologia,* v.13, p.230-235, 1982_b.

URMENYI, A.M.;FRANKLIN, A.W. Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet*. V.1, p: 313-315.1961.

U.S. Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*: *Cronobacter*c.29, 2012. Disponível em: http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm289378.htm Acessado em: 22 Fev 2013.

VAN ACKER, J.; SMET, F. de; MUYLDERMANS, G.; BOUGATEF, A.; NAESSENS, A.; LAUWERS, S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter Sakazakii* in powdered milk formula. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, p.293-297, 2001.

WARNKEN, M. B. *Cronobacter spp.: do isolamento à pesquisa de marcadores de virulência*. Tese de Doutorado em Vigilância Sanitária - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2010.140p.

WATANUKI, M. M. *Detecção de Bacillus cereus em leite e avaliação da germinação de seus esporos à temperatura ambiente e sob refrigeração após processo de fervura*. 2008. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Escola superior de agricultura Eça de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2008.

WHO, World Health Organization. *Surveillance Standards for Antimicrobial Resistance*. 2002. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_CDS_CSR_DRS_2001.5.pdf> Acessado em 23, Mar., 2013.

WHO.World Health Organization.*The global strategy for infant and young child feeding*. 2003. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/publications/gs_infant_feeding_text_eng.pdf.> Acessado em: 12, Fev, 2013.

WHO. World Health Organization. *1st Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance*: Scientific assessment, Geneva. 2004. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/nov2003/en/. Acessado em: 23 Nov 2013.

WHO/FDA.World Health Organization / Food and Agricultural Organization. *Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula .Guidelines*. 2007. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif_guidelines.pdf . Acessado em: 23 Abr. 2013.

WHO.World Health Organization. *About risk analysis in food.* 2008. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/micro/riskanalysis/en/> Acessado em 25, Jan, 2013.

WHO.World Health Organization.*10 Facts on Food Safety.*2009. Disponível em: <http://www.who.int/features/factfiles/food_safety/en/index.html> Acessado em: 15, Out., 2013.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION GLOBAL GUIDELINES. *Acute diarrhea in adults and children*: A global perspective, 2012. Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/Acute%20Diarrhea_long_FINAL_120604.pdf> Acessado em: 22, Fev., 2013.

ZINK, D. (2003). *Powdered infant formula*: an overview of manufacturing processes. Disponível em: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3939b1_tab4b.pdf.> Acessado em 19 Mar 2013.

8 **APÊNDICES**

TABELA 13: Comportamento das estirpes de *E.coli*. isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e em Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) aos antimicrobianos testados.

ABT	MF							FID		
	ESTIRPES							ESTIRPES		
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3
AMI										
AMP										
ATM										
CAZ										
CFL										
CFO										
CLO										
CRO										
CTX										
GEN										
SUT										
TET										

SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE

ABT: Antibiótico; Eq: Estirpes de queijo MF; Ef: Estirpes de FID

TABELA 14: Comportamento das estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e em Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) aos antimicrobianos testados.

ABT	MF							FID		
	ESTIRPES							ESTIRPES		
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3
CLIN										
ERI										
OXA										
PEN										
TEC										
CLO										
CRO										
TET										
GEN										
CFO										
VAN	VAN	VAN	VAN	VAN	VAN	VAN	VAN	ATM	ATM	ATM

SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE

ABT: Antibiótico; Eq: Estirpes de queijo MF; Ef: Estirpes de FID; ATM: AZTREONAM

TABELA 15: Comportamento das estirpes de *Salmonella* spp. isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e em Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) aos antimicrobianos testados.

ABT	MF							FID								
	ESTIRPES							ESTIRPES								
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	8	9
AMI																
AMP																
ATM																
CAZ																
CFL																
CFO																
CLO																
CRO																
CTX																
GEN																
SUT																
TET																

SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE

ABT: Antibiótico; Eq: Estirpes de queijo MF; Ef: Estirpes de FID

TABELA 16: Comportamento das estirpes de *Bacillus cereus* isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e em Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) aos antimicrobianos testados.

ABT	MF							FID				
	ESTIRPES							ESTIRPES				
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5
CLIN												
ERI												
OXA												
PEN												
TEC												
VAN												
ATM												
CFO												
CRO												
CLO												
GEN												
TET												

SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE

ABT: Antibiótico; Eq: Estirpes de queijo MF; Ef: Estirpes de FID

TABELA 17: Comportamento das estirpes de *Cronobacter* spp. isoladas em queijo Minas Frescal (MF) e em Fórmulas Infantis Desidratadas (FID) aos antimicrobianos testados.

ABT	MF													FID									
	ESTIRPES													ESTIRPES									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AMI	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
AMP	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
CFL	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
CTX	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
CAZ	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
SUT	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
ATM	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
CFO	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
CRO	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
CLO	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
GEN	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
TET	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B

SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE

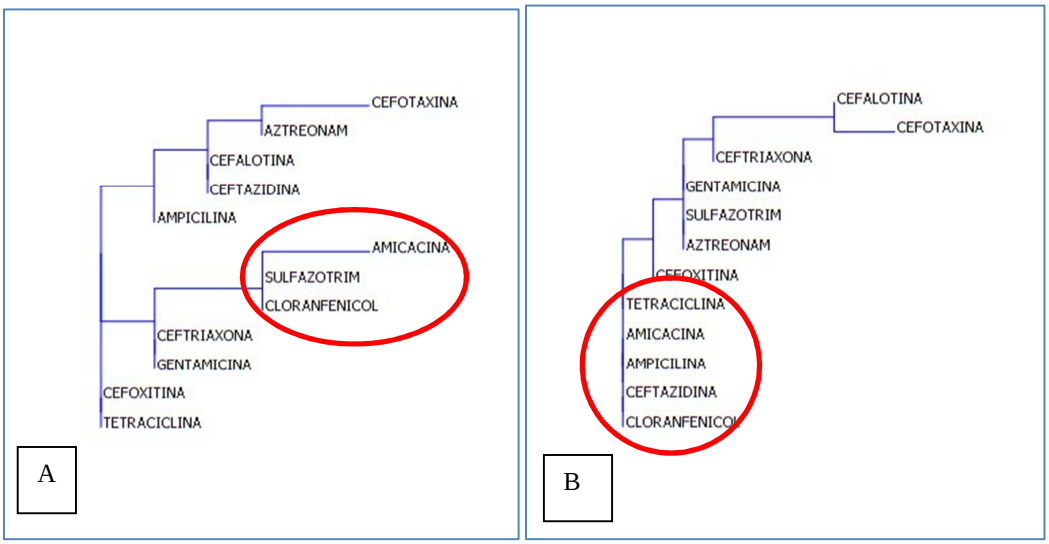
ABT: Antibiótico; Eq: Estirpes de queijo MF; Ef: Estirpes de FID; A: 35℃; B: 44℃

QUADRO 1: comparação entre a sensibilidade dos agentes antimicrobianos à *Cronobacter* spp. para a qual houve diferença significativa entre a sensibilidade das estirpes encontradas em queijo MF e FID.

Kruskal-Wallis test for equal medians
H (chi2): 7,363
Hc (tie corrected): 7,454
p (same): 0,006329
There is a significant difference between sample medians

Complementarmente, as figuras abaixo, agrupam os antimicrobianos em função da sensibilidade apresentada pelas estirpes encontradas.

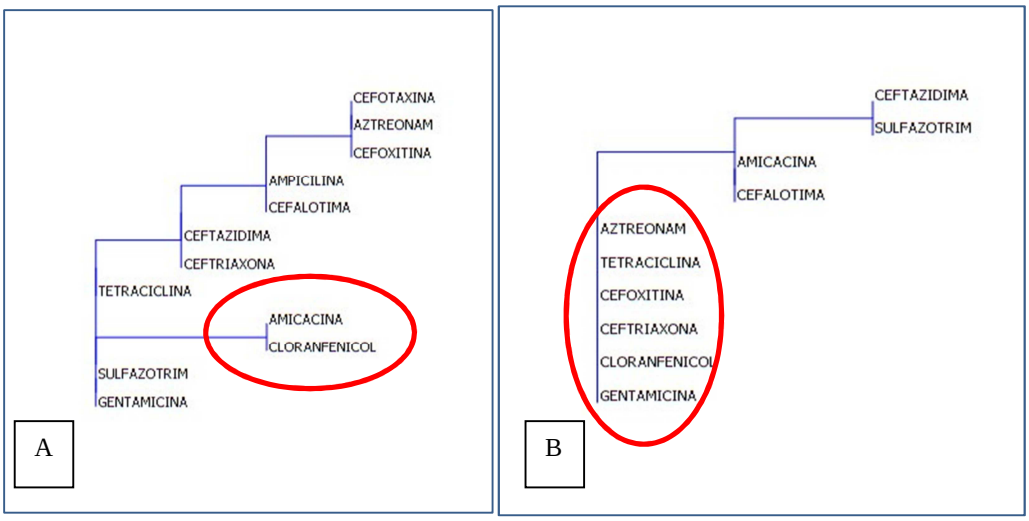
FIGURA 28: Padrão de agrupamento dos antimicrobianos testados para *Cronobacter* spp. em amostras de queijo MF (A) e FID (B), mostrando padrão de comportamento distinto. O círculo vermelho representa os antimicrobianos com maior sensibilidade.



QUADRO 2: comparação entre a sensibilidade dos agentes antimicrobianos para *E. coli* para a qual houve diferença significativa entre a sensibilidade das estirpes encontradas em queijo MF e FID.

Kruskal-Wallis test for equal medians
H (chi2): 5,851
Hc (tie corrected): 6,052
p (same): 0,01389
There is a significant difference between sample medians

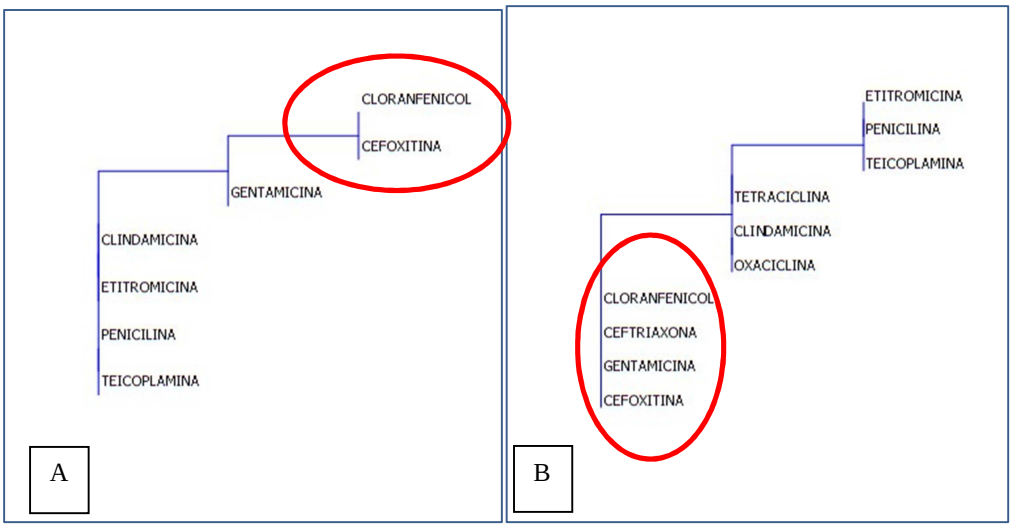
FIGURA 29: Padrão de agrupamento dos antimicrobianos testados para *E. coli* em amostras de queijo MF (A) e FID (B), mostrando padrão de comportamento distinto. O círculo vermelho representa os antimicrobianos com maior sensibilidade.



QUADRO 3: comparação entre a sensibilidade dos agentes antimicrobianos para *Staphylococcus* coagulase positiva para a qual houve diferença significativa entre a sensibilidade das estirpes encontradas em queijo MF e FID

Kruskal-Wallis test for equal medians
H (chi2): 3,922
Hc (tie corrected): 4,093
p (same): 0,04305
There is a significant difference between sample medians

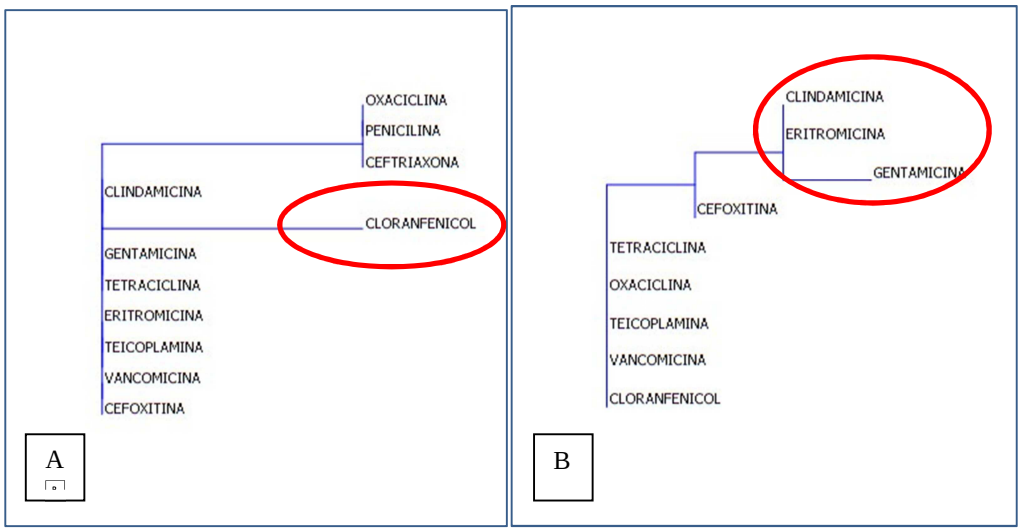
FIGURA 30: Padrão de agrupamento dos antimicrobianos testados para *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de queijo MF (A) e FID (B), mostrando padrão de comportamento distinto. O círculo vermelho representa os antimicrobianos com maior sensibilidade.



QUADRO 4: comparação entre a sensibilidade dos agentes antimicrobianos para *Bacillus cereus* para a qual houve diferença significativa entre a sensibilidade das estirpes encontradas em queijo MF e FID.

Kruskal-Wallis test for equal medians
H (chi2): 9,827
Hc (tie corrected): 10,67
p (same): 0,001086
There is a significant difference between sample medians

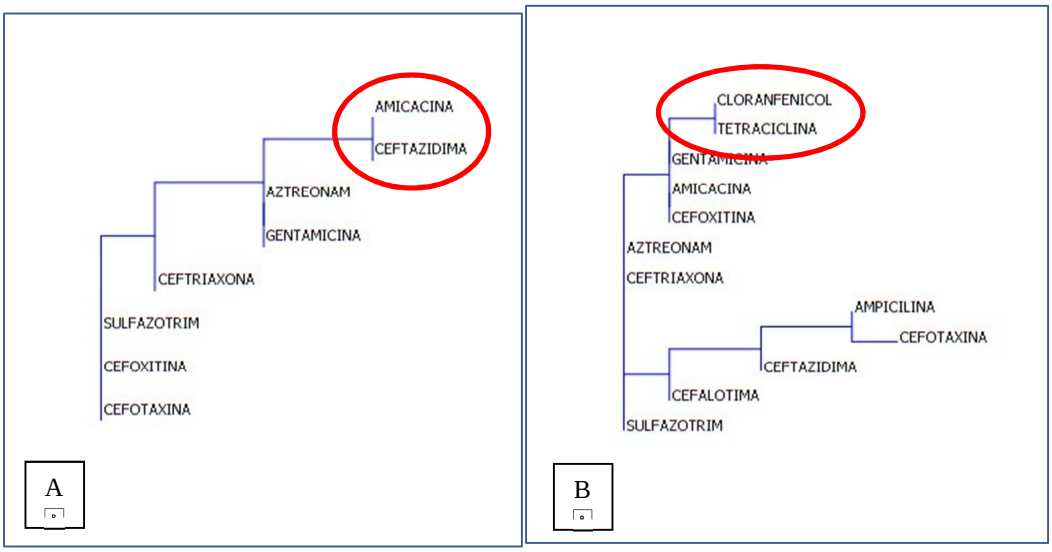
FIGURA 31: Padrão de agrupamento dos antimicrobianos testados para *Bacillus cereus* em amostras de queijo MF (A) e FID (B), mostrando padrão de comportamento distinto. O círculo vermelho representa os antimicrobianos com maior sensibilidade.



QUADRO 5: comparação entre a sensibilidade dos agentes antimicrobianos para *Salmonella spp.* para a qual houve diferença significativa entre a sensibilidade das estirpes encontradas em queijo MF e FID.

Kruskal-Wallis test for equal medians
H (chi2): 1,12
Hc (tie corrected): 1,144
p (same): 0,2848
There is no significant difference between sample medians

FIGURA 32: Padrão de agrupamento dos antimicrobianos testados para *Salmonella* spp. em amostras de queijo MF (A) e FID (B), mostrando padrão de comportamento distinto. O círculo vermelho representa os antimicrobianos com maior sensibilidade.



9 ANEXOS

TABELA 18 : Perfil bioquímico da *E. Sakazakii* e outras bactérias da família Enterobacteriaceae – percentual de estirpes positivas para cada prova:

	Microrganismos					
BIOQ	*Enterobacter sakazakii*	*Enterobacte cloacae*	*Pantoea agglomerans*	*Escherichia vulneris*	*Klebsiella oxytoca*	*Klebsiella Planticola*
ONPG	98	0	7	25	1	1
ADH	99	97	0	30	0	0
LDC	0	0	0	85	99	100
ODC	91	96	0	0	0	0
H_2S	0	0	0	0	0	0
URE	1	65	20	0	90	98
VP	100	100	70	0	95	98
IND	11	0	20	0	99	20
CIT	99	100	50	0	95	100
MAL	18	75	65	85	98	100
SOR	0	95	30	1	99	92
SAC	100	97	75	8	100	100

Fonte: Adaptação de Richard, 1984.