

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

VINICIUS DE OLIVEIRA ALVES

**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.**

UNIVERSIDADE  
FEDERAL  
FLUMINENSE

NITERÓI

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

VINICIUS DE OLIVEIRA ALVES

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

NITERÓI  
2013

VINICIUS DE OLIVEIRA ALVES

**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 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<sup>o</sup> Dr. ROBSON MAIA FRANCO

NITERÓI, RJ  
2013

VINICIUS DE OLIVEIRA ALVES

**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 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.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Robson Maia Franco- Orientador - UFF

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Dayse Lima da Costa Abreu - UFF

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Karen Signori Pereira– UFRJ

Niterói

2013

Aos meus pais, Vera e Sebastião,  
e as minhas irmãs Simone e Susana.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me permitir aprender a cada dia, na companhia de seres especiais, como os que me rodeiam.

Aos meus pais, Vera e Sebastião, por toda dedicação à minha educação e formação pessoal.

As minhas irmãs, Simone e Susana, por todo apoio, paciência, confiança, carinho, conselhos (...). Vocês são imprescindíveis em minha vida.

Ao meu orientador, e amigo Robson Maia Franco, pela disponibilidade, dedicação, apoio, respeito, conselhos, conversas (...).

Ao professor Robson Lopes Abreu, pelo apoio profissional, aprendizado e confiança.

A Ediná Rodrigues (Dina), especial em minha formação profissional, responsável pela minha dedicação e respeito às pesquisas microbiológicas. Hoje especial em minha vida pessoal.

Aos meus amigos “Ruralinos”, que embora eu estivesse ausente, estavam sempre presentes.

Aos amigos da Uff por me receberem de braços abertos e me ajudarem nessa imersão ao mundo da pesquisa. Obrigado pelos momentos importantes de aprendizado durante esse período de trabalho.

Aos amigos Daniel, Letícia, Marilú e Stéfani, imprescindíveis para o sucesso da pesquisa. Obrigado pelo apoio, amizade e companheirismo.

Aos amigos Julia e Eduardo, pelo apoio, presença e amizade.

Aos amigos da pensão, pela amizade e momentos de descontração durante esses dois anos de trabalho.

Aos amigos João Paulo, Quírio, Raquel e Bianca, pela colaboração.

Aos professores do Programa de Pós-graduação, pela dedicação, aprendizado e colaboração em minha formação profissional.

Aos secretários, André, Dráusio e Mariana, pelo apoio, preocupação e disponibilidade.

À CAPES, pelo apoio financeiro concedido para realização deste projeto.

*“És forte porque estás próximo da origem da criatura. És nutritivo porque manténs o melhor do leite. És quente, porque és gordo.”*

*Hipócrates, “médico” grego (450 a.C.), acerca do queijo.*

## RESUMO

No período de dezembro de 2011 a fevereiro de 2012, avaliou-se a qualidade bacteriológica de 60 amostras de queijos minas frescal, de produção artesanal, através dos parâmetros estabelecidos em legislação (BRASIL, 2001) para contagens de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva, e presença dos microrganismos *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. As amostras foram colhidas em feiras livres da cidade de Volta Redonda, localizada na região sul fluminense do estado do Rio de Janeiro. Além das pesquisas exigidas para o julgamento do produto em próprio ao consumo, foram avaliadas as contagens de coliformes totais, presença e contagem de *Escherichia coli*, além de identificação de outras espécies de *Listeria* spp. Em relação à presença de Coliformes termotolerantes, 34 (56,6%) amostras apresentaram-se em desacordo com estabelecido, com contagens entre  $1,2 \times 10^5$  e  $7,5 \times 10^{10}$  UFC/g. Dentre as matrizes alimentícias analisadas, 58 (96,6%) foram consideradas impróprias ao consumo humano por superarem os limites de contagens para *Staphylococcus* coagulase positiva. Na pesquisa para presença de *Salmonella* spp., nove (15%) amostras, foram consideradas impróprias ao consumo humano, por possuírem o microrganismo em 25g das amostras analisadas. A *Listeria monocytogenes* não foi isolada em nenhum dos queijos avaliados, porém constataram-se outras espécies do gênero em cinco amostras. Baseado nos limites estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), 100% das amostras avaliadas foram consideradas impróprias ao consumo humano. Na contagem de coliformes totais foram encontrados valores entre  $1,2 \times 10^5$  e  $9,4 \times 10^{10}$  UFC/g em 100% das amostras. *E. coli* foi encontrada em 11 (18,3%) amostras, com contagens entre  $2,4 \times 10^4$  UFC/g e  $3,7 \times 10^{10}$  UFC/g. Dentre as colônias de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas, 106 (44,53%) foram consideradas *S. aureus* (BRASIL, 2003). As estirpes de *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. isoladas, foram submetidas a ação de antimicrobianos para avaliação da susceptibilidade aos agentes. Nos resultados foram encontrados percentuais elevados de resistência das estirpes a determinados fármacos, destacando 92% e 83% dos isolados de *S. aureus* aos agentes Aztreonam e Penicilina. Os agentes, Aztreonam, Ampicilina e Ceftazidina, foram inibidores de apenas 21,44%, 35,72% e 35,75%, respectivamente, dos isolados de *E. coli* testados. A Gentamicina foi o antimicrobiano testado em estirpes de *Salmonella* spp. com maior eficiência, inibindo 95% das estirpes. Entre as espécies de *Listeria* spp. destacou-se a resistência das cinco estirpes isoladas ao agente Aztreonam. Interpretando-se os resultados encontrados concluiu-se que as amostras das partidas analisadas podem ser consideradas de risco em potencial à saúde coletiva.

**Palavras-chave:** Intoxicação. Inocuidade. *Escherichia coli*. Antimicrobiano.

## ABSTRACT

Between December 2011 and February 2012, 60 samples of "Minas Frescal" farmhouse cheese were analyzed regarding to bacteriological quality. The counting processes for thermotolerant coliforms and *Staphylococcus* positive coagulase, as well as the testing for micro-organisms presence such like *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* were made according the established parameters by the brasilian legislation. These samples were collected at open air fairs in the city of Volta Redonda, southern region of the state of Rio de Janeiro. Besides obligatory researches for products consumption approval, were also evaluated the counting of total coliforms, presence testing and counting of *Escherichia coli*, and also the identification of *Listeria* spp. different species. Regarding the presence of thermotolerant coliforms, 34 (56,6%) of the collected samples were not on legislation compliance, showing values between  $1,2 \times 10^5$  and  $7,5 \times 10^{10}$  UFC/g. Amongst all analyzed products, 58 (96,6%) failed regarding consumption purposes, due to exceed the counting limits for *Staphylococcus* positive coagulase. On research testing for *Salmonella* spp. presence, 9 (15%) samples failed. The analysis on 25g of the product showed positive result for this micro-organism. On the other hand, the *Listeria monocytogenes* was not isolated in any of the analyzed cheeses, but other species of this kind were verified in five of the samples. Considering the limits established by the authority "Agência Nacional de Vigilância Sanitária" (BRAZIL, 2001), 100% of the analyzed samples were considered unfit for human consumption. The counting of total coliforms showed high values between  $1,2 \times 10^5$  and  $9,4 \times 10^{10}$  UFCG/g, in 100% of the samples. *E. coli* micro-organism was found in 11 (18,3%) samples, counting values between  $2,4 \times 10^4$  and  $3,7 \times 10^{10}$  UFC/g. Among isolated *Staphylococcus* positive coagulase colonies, 106 (44,53%) were considered *S. aureus* (Brazil, 2003). *E. Coli*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. isolated strains, were submitted to antimicrobial agents to verify their susceptibility to these agents. The results showed high percentuals of those strains tolerance to certain pharmaceuticals, where we can highlight the 92% of isolated *S. aureus* tolerant to Aztreonam agents and 83% of them tolerant to Penicillin agents. Aztreonam, Ampicillin and Ceftazidin agents proved to be capable of inhibiting only 21,44%, 35,72% and 35,75% respectively, of tested isolated *E. coli* micro-organisms. Gentamicin turned out to be the more efficient antimicrobial tested on *Salmonella* spp. strains, inhibiting 95% of them. Among the *Listeria* spp. species, we can highlight the tolerance of all 5 isolated strains to Aztreonam agent. After examining all retrieved data, we can conclude that all samples analyzed can be considered potential risk to public health.

**Keywords:** Intoxication. Innocuity. *Escherichia coli*. Antimicrobial.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Gráfico 1** Avaliação do número de amostras de queijos minas frescal em conformidade com o limite estabelecido para temperatura de conservação, p.70
- Gráfico 2** Representação, em quartis, da variável temperatura nas amostras dos diferentes boxes de comercialização, p.70
- Gráfico 3** Representação, em quartis, da variável umidade nas amostras dos diferentes boxes de comercialização, p.71
- Gráfico 4** Representação, em quartis, da variável pH nas amostras dos diferentes boxes de comercialização, p.73
- Gráfico 5** Representação, em quartis, da variável *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras dos diferentes boxes de comercialização, p.76
- Gráfico 6** Classificação das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos minas frescal em relação ao grau de coagulação, p.77
- Gráfico 7** Resultado das provas de DNase e Termonuclease das cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas isoladas, p.78
- Gráfico 8** Diagramas de extremos e quartis (Box-plot) da variável coliformes totais, p.79
- Gráfico 9** Representação em quartis da variável coliformes totais nos dos diferentes boxes de comercialização, p.80
- Gráfico 10** Diagramas de extremos e quartis (Box-plot) da variável coliformes termotolerantes, p.81
- Gráfico 11** Avaliação das amostras contaminadas em relação a presença de coliformes termotolerantes em cada boxe de comercialização, p.82
- Gráfico 12** Representação em quartis da variável coliformes termotolerantes nos diferentes boxes de comercialização, p.83
- Gráfico 13** Diagramas de extremos e quartis (Box-plot) da variável *E. coli*, representado em log UFC/g, p.85
- Gráfico 14** Representação em quartis da variável *E. coli* nos diferentes boxes de comercialização, p.86
- Gráfico 15** Percentuais das cepas de *E. coli* encontrados para cada patotipo após as provas sorológicas, p.87

- Gráfico 16** Identificação dos sorogrupos das estirpes de *E. coli* isoladas, p.88
- Gráfico 17** Número de amostras confirmadas para presença de *Salmonella* spp. em cada ponto de comercialização, p.90
- Gráfico 18** Representação do número de amostras contaminadas por *Listeria* spp. em cada um dos boxes de comercialização, p.93
- Gráfico 19** Representação em quartis das concentrações de coliformes totais nas amostras analisadas em relação à presença e ausência de *Listeria* spp., p.95
- Gráfico 20** Representação em quartis das concentrações de *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras analisadas em relação à presença e ausência de *Listeria* spp. , p.95
- Gráfico 21** Relação percentual das reações das estirpes isoladas de *Staphylococcus* de alto risco patogênico à ação dos antimicrobianos, p.96
- Gráfico 22** Relação percentual das reações das estirpes isoladas de *E. coli* à ação dos antimicrobianos, p.99
- Gráfico 23** Relação percentual das reações das estirpes isoladas de *Salmonella* spp. em relação à ação dos antimicrobianos, p.102
- Gráfico 24** Relação das estirpes isoladas de *Listeria* spp. em relação à ação dos antimicrobianos, p.104
- Fig. 1** Boxes de comercialização de produtos de origem animal em feiras livres na cidade de Volta Redonda- RJ, p.40
- Fig. 2** Câmara asséptica preparada para as análises bacteriológicas, p.42
- Fig. 3** Colônias com crescimento característico de Coliformes em meio VRBA, p.45
- Fig. 4** Resultado positivo para Coliformes totais em Caldo VBBL, confirmado pela presença de gás no interior do tubo de Durham, p.46
- Fig. 5** Resultado positivo para Coliformes termotolerantes em Caldo EC, confirmado pela presença de gás no interior do tubo de Durham, p.46
- Fig. 6** Colônias com crescimento característico de *E. coli* em Ágar Eozina Azul de Metileno, p.47
- Fig. 7** Resultado positivo para a prova do indol, após adição de reativo de Kovac's, confirmado pela coloração avermelhada do halo na superfície do meio MILI, p.49

**Fig. 8** Resultado positivo para as provas de VM/VP, confirmado pela coloração avermelhada do meio e do halo de superfície, respectivamente, após a adição das substâncias de reação, p.50

**Fig. 9** Resultado da prova do Citrato em meio Ágar Citrato Simmons. A coloração azulada do meio confirma a presença de microrganismos que utilizam o citrato como única fonte de energia, p.51

**Fig. 10** Prova de DNase. A presença de halo róseo ao redor da linha de crescimento, após a adição de azul de toluidina, classifica a prova como positiva, p.55

**Fig. 11** Recipiente improvisado, utilizado como câmara úmida nas provas de DNase para classificação das estirpes de *Staphylococcus coagulase positiva*, p.55

**Fig. 12** Reação positiva nas provas de termonuclease para classificação das estirpes de *Staphylococcus coagulase positiva*. Os halos claros ao redor dos poços de cultivo confirmam a presença da enzima, p.56

**Fig. 13** Coloração do Caldo Fraser após 24H de incubação. A coloração enegrecida confirma a suspeita para presença de *Listeria spp.*, consequente da reação entre a esculetina e íons férricos do meio, p.57

**Fig. 14** Colônias com crescimento característico de *Listeria spp.* em meio Oxford, p.58

**Fig. 15** Resultado positivo para a prova de motilidade de *Listeria spp.*, confirmado pelo crescimento característico em formato de guarda-chuva, p.59

**Fig. 16** Prova do CAMP teste, realizada em Ágar Columbia com 5% de Sangue de carneiro. A observação de zona clara de hemólise próxima à linha de crescimento confere a positividade da prova, p.60

**Fig. 17** Metodologia para avaliação da susceptibilidade das estirpes aos antimicrobianos testados. As reações são avaliadas em conformidade com o comprimento do halo formado ao redor dos discos, com os fármacos, p.64

**Fig. 18** Halômetro para aferição dos comprimentos dos halos na avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos, p.64

**Quadro 1-** Resultados das provas bioquímicas para identificação das estirpes de *Listeria spp.*, p.127

**Quadro 2-** Fórmula utilizada para contagens dos microrganismos quantitativos pesquisados nesse trabalho conforme consta na IN N°62 (BRASIL, 2003),p.127

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1-** Avaliação das amostras analisadas baseada nos parâmetros estabelecidos na RDC N°12 (BRASIL, 2001), p.68
- TABELA 2-** Amostras cuja presença de *E.coli* foi confirmada. Valores das contagens do microrganismo, características sensoriais das amostras positivas e respectivas estirpes isoladas, p.84
- TABELA 3-** Parâmetros físico-químicos das amostras positivas para presença de *Salmonella* spp. e condições de isolamento das estirpes, p.91
- TABELA 4-** Resultados obtidos nas provas para identificação da *Listeria* spp. , p.93
- TABELA 5-** Resultados encontrados nas aferições dos parâmetros físico-químicos e nas contagens dos microrganismos contaminantes nas amostras com presença confirmada de *Listeria* spp., p.94
- TABELA 6-** Valores percentuais do comportamento de 106 cepas de *Staphylococcus* de alto risco patogênico aos antimicrobianos testados, p.96
- TABELA 7-** Valores percentuais do comportamento de 27 cepas de *E. coli* aos antimicrobianos testados, p.99
- TABELA 8-** Avaliação do comportamento das estirpes isoladas de *Salmonella* spp. em relação aos antimicrobianos testados, p.101
- TABELA 9-** Avaliação do comportamento das estirpes isoladas de *Listeria* spp. em relação aos antimicrobianos testados, p.104
- TABELA 10-** Multirresistência das estirpes isoladas, p.105
- TABELA 11-** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 1, p.117
- TABELA 12-** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 2, p.117
- TABELA 13-** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 3, p.117
- TABELA 14-** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 4, p.118
- TABELA 15-** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 5, p.118

- TABELA 16-** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 6, p.118
- TABELA 17-** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 7, p.119
- TABELA 18-** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 8, p.119
- TABELA 19-** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 9, p.119
- TABELA 20-** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 10, p.120
- TABELA 21-** Médias dos valores encontrados nos boxes de comercialização, p.120
- TABELA 22-** Média dos valores encontrados nas 60 amostras avaliadas, p.121
- TABELA 23-** Reação das estirpes, de *Staphylococcus* coagulase positiva, isoladas nos 1º e 2º dias, aos antimicrobianos testados, p.122
- TABELA 24-** Reação das estirpes, de *Staphylococcus* coagulase positiva, isoladas nos 3º e 4º dias de colheita, aos antimicrobianos testados, p.123
- TABELA 25-** Reação das estirpes, de *Staphylococcus* coagulase positiva, isoladas nos 5º e 6º dias de colheita, aos antimicrobianos testados, p.124
- TABELA 26-** Reação das estirpes de *Escherichia coli* aos antimicrobianos testados, p.125
- TABELA 27-** Comportamento das estirpes de *Salmonella* spp. em relação aos antimicrobianos testados, p.126
- TABELA 28-** Comportamento das estirpes de *Listeria* spp. em relação aos antimicrobianos testados, p.126

## LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Aa	Atividade de água
ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijos
ABP	Ágar Baird- Parker
ACS	Ágar Citrato Simmons
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AO	Ágar Oxford
APC	Ágar Padrão para Contagem
ASDC	Ágar Sangue Desfibrinado de Carneiro
ASS	Ágar Salmonella Diferencial
ATN	Ágar Triptose com Ácido Naxílico
AVB	Ágar Verde Brilhante
BHI	“ Infusion Hearth Breain ”
CF	Caldo Fraser
CR	Caldo Rapaport Vassiliadis
CS	Caldo Selenito Cistina
DA	Doença de Origem Alimentar
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos,
DVA	Doenças Veiculadas a Alimentos
EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
EHEC	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva
EMB	Eosin Metilen Blue
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatogênica Classica
IN	Instrução Normativa
LIA	“ Lysina Iron Agar ”
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MILI	Motilidade Indol Lisina
ml	Mililitro
MMA	“ MC BRIDE <i>Listeria</i> AGAR ”
MS	Mistério da Saúde

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SP	São Paulo
SSP	Solução Salina Peptonada
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TSI	“ Triple Sugar Iron ”
UFC	Unidades formadora de colônias
UVM	Modified <i>Listeria</i> Enrichment Broth
VBBL	Caldo Verde Brilhante Bile 2% Lactose
VM	Vermelho de metila
VP	Voges-Proskauer
VRBA	“Violeta Red Bile Agar”

## SUMÁRIO

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES,  
LISTA DE TABELAS,  
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS,  
RESUMO,  
ABSTRACT**

**1 INTRODUÇÃO, p.18**

**2 OBJETIVOS, p.20**

2.1 OBJETIVO GERAL, p.20

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p.20

**3 JUSTIFICATIVA, p.21**

**4 REVISÃO DE LITERATURA, p.22**

4.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS, p.24

4.2 LEITE E DERIVADOS COMO VEICULADOR DE AGENTES PATOGÊNICOS,  
p.26

4.3 QUEIJOS, p.28

4.4 QUEIJOS NO BRASIL, p.29

4.5 QUEIJO MINAS FRESCAL, p.30

4.5.1 **Coliformes, p.31**

4.5.1.1 *Escherichia coli*, p.32.

4.5.2 ***Staphylococcus coagulase positiva*, p.33**

4.5.3 ***Salmonella spp.*, p.35**

4.5.4 ***Listeria spp.*, p.36**

4.6 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA, p.37

**5 MATERIAL E MÉTODOS, p.40**

5.1 MATERIAL, p.40

5.2 MÉTODOS, p.40

5.2.1 **Colheita e Identificação das amostras, p.40**

5.2.2 **Transporte, p.41**

5.2.3 **Preparo das subamostras para procedimento analítico, p.41**

5.3 ANÁLISES, p.43

5.3.1 **Análise Físico-Químicas, p.43**

5.3.1.1 Umidade, p.43

5.3.1.2 pH, p.43

5.3.1.3 Temperatura, p.43

5.3.2 **Análises Bacteriológicas, p.44**

5.3.2.1 Contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes, p.44

5.3.2.2 Avaliação e Contagem de *E. coli*, p.47

5.3.2.2.1 *Avaliação da produção do Indol e da Motilidade*, p.48

5.3.2.2.2 *Teste de Vermelho de Metila e Voges-Proskauer*, p.49

5.3.2.2.3 *Prova do Citrato*, p.50

5.3.2.2.4 *Sorologia das estirpes confirmadas de E. coli*, p.51

5.3.2.3 Isolamento e contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*, p.52

5.3.2.3.1 *Prova da coagulase*, p.53

- 5.3.2.3.2 *Prova da catalase*, p.53
- 5.3.2.3.3 *Identificação de S. aureus*, p.54
- 5.3.2.4 *Isolamento de Listeria monocytogenes*, p.56
- 5.3.2.5 *Isolamento de Salmonella spp.* p.61
  - 5.3.2.5.1 *Provas confirmatórias*, p.62
  - 5.3.2.5.2 *Sorologia*, p.63
- 5.3.3 **Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana**, p.64
- 5.3.4 **Avaliação estatística**, p.65

## **6 RESULTADOS**, p.66

## **7 DISCUSSÃO**, p.69

- 7.1 **PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS**, p.69
- 7.2 **PRESENÇA E CONTAGENS DE MICRORGANISMOS**, p.73
  - 7.2.1 ***Staphylococcus coagulase positiva***, p.73
  - 7.2.2 **Coliformes totais, termotolerantes e *E. coli***, p.78
  - 7.2.3 ***Salmonella spp.***, p.89
  - 7.2.4 ***Listeria monocytogenes***. p.91
- 7.3 **SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS**, p.95
  - 7.3.1 ***Staphylococcus* considerados de alto risco patogênico**, p.95
  - 7.3.2 ***E. coli***, p.99
  - 7.3.3 ***Salmonella spp.***, p.101
  - 7.3.4 ***Listeria spp.***, p.103

## **8 CONCLUSÕES**, p.106

## **9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, p.107

## **10 APÊNDICES**, p.117

## **11 ANEXOS**, p.127

## 1 INTRODUÇÃO

Todo ser humano tem direito a alimento seguro, e cabe aos órgãos fiscalizadores o zelo por tal conquista. No Brasil, surtos de intoxicações e contaminações causados por agentes patogênicos veiculados a alimentos são significativos. Gastos nas áreas de saúde, no país, seriam evitados caso houvesse uma fiscalização mais eficiente e rigorosa.

Produtos de origem animal associam-se a surtos de doenças, por possuírem condições propícias à adaptação e multiplicação de agentes patogênicos. A criação de animais fornecedores de alimentos exige cumprimentos legais, a fim de se obter produtos de qualidade, com elevado valor nutritivo, características sensoriais preservadas e ausência de contaminação nociva à saúde do consumidor. Há de se atentar a todas as fases de criação do animal, além das etapas de processamento da matéria prima, para que o produto alimentício ofertado tenha inocuidade e qualidade asseguradas.

No Brasil, país de grande diversidade cultural e social, a produção animal focada no mercado alimentício é comum, e quando não, ou má, fiscalizada, pode contribuir com a veiculação de agentes causadores de doenças. As bactérias estão entre os principais agentes etiológicos de doenças humanas, veiculadas em alimentos, e sua susceptibilidade aos antimicrobianos disponíveis influencia no sucesso do tratamento terapêutico de determinadas patologias. O uso indiscriminado de fármacos na medicina humana e veterinária tem selecionado cepas bacterianas mais resistentes, dificultando a escolha de protocolos terapêuticos ao combate a certos agentes.

Todo manejo do animal durante sua criação, incluindo alimentação e tratamentos terapêuticos, assim como produtos de higienização e sanitização de equipamentos e utensílios utilizados no processamento da matéria prima, podem influenciar na resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos.

Produtos de origem animal de qualidade duvidosa estão disponíveis aos consumidores por todo o país, principalmente no comércio informal, desprovido de fiscalização adequada e acompanhamento profissional competente. Este tipo de comércio pode ser pernicioso à saúde coletiva, uma vez que atinge uma porção significativa da população, atraída por produtos artesanais de valor econômico mais acessível.

Neste trabalho objetivou-se averiguar a qualidade higiênico-sanitária de queijos minas frescal artesanais, comercializados em feiras livres da cidade Volta Redonda- RJ, além de avaliar a susceptibilidade, a antimicrobianos, das estirpes patogênicas isoladas. As amostras foram submetidas às análises propostas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para classificar as condições do produto ao consumo humano, e ainda a análises necessárias para avaliação higiênica, físico-química e ao isolamento de determinados agentes patogênicos, para os testes de susceptibilidade a antimicrobianos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade higiênico-sanitária de amostras de queijo minas frescal comercializados em feiras livres da cidade de Volta Redonda, localizada na região sul do estado do Rio de Janeiro, e averiguar a sensibilidade antimicrobiana das estirpes bacterianas patogênicas isoladas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram desenvolvidos conforme se segue:

- a) Contar coliformes totais.
- b) Contar coliformes termotolerantes.
- c) Contar e isolar *Escherichia coli*.
- d) Contar e isolar *Staphylococcus coagulase positiva*.
- e) Identificar cepas de *S. aureus*.
- f) Avaliar a presença de *Salmonella* spp.
- g) Avaliar a presença de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*.
- h) Testar a suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de *E. coli* isoladas.
- i) Testar a suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de *Staphylococcus coagulase positiva* isoladas.
- j) Testar a suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de *Salmonella* spp. isoladas.
- k) Testar a suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de *Listeria* spp. isoladas.
- l) Aferir a temperatura das amostras no momento da colheita.
- m) Aferir o pH das amostras.
- n) Avaliar o percentual de umidade das amostras.

### 3 JUSTIFICATIVA

A qualidade dos alimentos de origem animal comercializados em feiras livres é questionável, podendo apresentar riscos à saúde dos consumidores. Não há comprovações da procedência da matéria prima utilizada, das condições de processamento, transporte e armazenamento dos produtos, além de, na maioria das vezes, ser precária a fiscalização que preze pela inocuidade deste tipo alimento, cuja qualidade é julgada pelos próprios produtores e consumidores, baseados em parâmetros sensoriais.

Os derivados lácteos estão entre os produtos de origem animal mais comercializados informalmente devido à facilidade em seu beneficiamento e a aceitação no mercado, o que atrai pequenos criadores a ofertarem suas produções artesanais. A falta de infraestrutura e conhecimento técnico na fabricação aliada à má fiscalização em estabelecimentos e pontos de comercialização, fazem desses alimentos possíveis veiculadores de patógenos. A fim de alertar aos profissionais que prezam pela saúde coletiva e também aos consumidores, é de suma importância informações em relação à qualidade desses produtos lácteos visto que oferecem condições físico-químicas ideais para adaptação e multiplicação de microrganismos patogênicos, procedentes da manipulação humana e de animais.

Como em outras cidades brasileiras, a comercialização informal de alimentos de origem animal é realizada na cidade de Volta Redonda em feiras livres, onde 60% dos pontos de venda de produtos do gênero comercializam derivados lácteos fabricados artesanalmente, sendo o queijo minas frescal o mais ofertado. Sendo assim de suma importância a avaliação da qualidade destes produtos, principalmente por serem de consumo imediato, isentos de qualquer processamento entre a aquisição e o consumo.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

A domesticação dos animais mamíferos, no Período Neolítico da pré-história, cerca de 10.000 anos a.C culminou na descoberta de suas secreções mamárias como fonte de energia. O leite oriundo da ordenha, inicialmente de cabras e bovinos, primeiros mamíferos domesticados, supria parte das necessidades energéticas dos homens por apresentar teores significativos de carboidratos e gordura. Altamente perecível, era consumido fresco e em curto período de tempo, sendo armazenado, quando necessário, em vísceras infladas de animais, para facilitar seu transporte. Estima-se que essa forma de armazenamento, embora sem relatos comprovados, tenha permitido a observação da coagulação da matéria fluida, consequente da ação de enzimas presentes nas vísceras. A massa formada era de sabor agradável, com durabilidade superior ao produto ordenhado, e tornou-se uma alternativa de consumo. O sal, já conhecido como auxiliar na conservação de alimentos, era adicionado à massa garantindo, além da preservação, melhoria em seu sabor (GEIGL, 2008; ZEDER; HESSE, 2000).

Embora seja relatado o consumo de queijos em passagens bíblicas (Samuel 17: 17-18), a mais antiga evidência arqueológica de sua fabricação foi encontrada nas pinturas de uma tumba egípcia datada em 2000 a.C (TRINDADE, 2012). Os primeiros queijos foram fabricados no Oriente Médio ou Ásia Central, sendo a atividade, posteriormente, disseminada pela Europa (HARBUTT, 2010). Durante a Idade Média a elaboração dos derivados se diversificou com aromas, sabores e consistências distintos. Nesse período as produções concentravam-se em mosteiros, e eram os monges os responsáveis por inovações como adição de especiarias ao leite para melhorar seu sabor e utilização de diferentes métodos de conservação da massa coagulada. Muitos dos queijos conhecidos foram registrados no final da Idade Média. Também foram os monges os primeiros a valorizarem a higienização e a qualidade do leite como fatores influentes nas características dos derivados lácteos (LEANDRO, 2008). A presença de bactérias no leite foi observada por Athanasius Kircher em 1659 e ratificada em 1847 por Bondeuau, justificando as observações dos monges (JAY, 2005). Os religiosos foram capazes de observar que as condições de preparo do produto e a qualidade da matéria submetida ao beneficiamento influenciavam em seu rendimento, em seus aspectos sensoriais e em sua preservação. Diante disso criavam recipientes específicos para o

armazenamento do leite fluido, além de preconizarem a manutenção das massas coaguladas em ambientes apropriados (CHALITA, 2009). A comercialização dos laticínios era realizada em feiras, nas ruas de pequenas vilas, sendo o rendimento, o sabor e a durabilidade os únicos fatores responsáveis pela preocupação dos fabricantes com a higienização no processamento (HARBUTT, 2010).

A Revolução Industrial, na Europa, alavancou as produções, devido ao uso de maquinários especializados e de melhorias nas condições de transporte, possibilitando o deslocamento, em menor tempo, de quantidades maiores de leite fresco sem comprometer sua qualidade, entre as áreas rurais e as cidades. Essas mudanças foram fundamentais para a disseminação da atividade, por toda a Europa, permitindo em 1815, na Suíça, a inauguração da primeira fábrica de queijos. O aumento gradual do consumo desse derivado lácteo atraía investimentos de outras culturas, como a Oriental e a Americana, que iniciavam suas produções. Em 1851, os Estados Unidos já fabricavam queijos em larga escala (CHALITA, 2009)

Louiz Pasteur, em 1857, observou que os microrganismos presentes no leite eram responsáveis pelo seu azedamento. No mesmo ano, W. Taylor incriminou o leite como responsável pela febre tifoide, e sua microbiota, conhecida pela influência que exercia na qualidade e conservação, passou a apresentar riscos a seus consumidores (JAY, 2005). A veiculação de agentes patogênicos pelo leite influenciou pesquisas que visassem à melhoria de sua qualidade e garantissem a segurança dos consumidores. Em 1864, após observar a resposta de certos microrganismos à ação de temperaturas elevadas, Pasteur criou a pasteurização, sugerida por Fran Von Soxhlet, em 1886, para que fosse utilizada no leite com o objetivo de inativar a microbiota nociva aos consumidores. No ano de 1890 iniciou-se a pasteurização do leite comercial nos EUA (JAY, 2005).

Embora satisfatória, e ainda hoje utilizada, a pasteurização não foi suficiente para que o leite deixasse de ser incriminado como veiculador de agentes patogênicos (SILVA et al., 2001; SILVA et al., 2010). Vários fatores têm contribuído para esta situação: a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; a urbanização desordenada e a produção de alimentos em grande escala; a produção e comercialização informal; a exigência de maiores cuidados na criação dos animais, além de fiscalizações inadequadas, dos estabelecimentos comerciais e produtores de alimentos (BRASIL, 2010).

#### 4.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Doenças cujos agentes etiológicos são veiculados a alimentos, genericamente chamadas de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), de Origem Alimentar (DA) ou ainda Doenças Veiculadas a Alimentos (DVA), são caracterizadas pelo comprometimento do sistema digestório em humanos, causando dores gástricas, náuseas, vômitos e diarreias. Podem ocorrer também afecções em meninges, rins, fígado, sistema nervoso central e, em casos mais graves, diarreia sanguinolenta, insuficiência respiratória e renal agudas. A duração dos sintomas varia de poucas horas a dias, sendo influenciada pelo estado imunológico do paciente, quantidade de alimento, espécie do microrganismo e tipo de toxina, ingeridos (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005).

Segundo Franco e Landgraf (2003), a contaminação de alimentos pode ser classificada em perigos químico, físico e biológico; sendo as enfermidades de natureza biológica subdivididas em intoxicações e toxinfecções alimentares. A intoxicação alimentar é decorrente da ingestão de toxinas presentes em alimentos e produzidas a partir de concentrações elevadas de microrganismos produtores da substância. Quando se ingere alimentos contaminados por microrganismos capazes de aderirem à mucosa intestinal, e ou de colonizarem outras células produzindo toxinas nocivas, têm-se as toxinfecções. Conforme Germano e Germano (2010), as contaminações de natureza biológica são o principal perigo à Saúde coletiva, e as bactérias são os agentes mais envolvidos em surtos alimentares.

A importância da veiculação das bactérias em alimentos é confirmada pelo Ministério da Saúde (MS), por meio de dados referentes a surtos alimentares ocorridos no Brasil, entre os anos 2000 e 2011, em que constam os agentes *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* entre os principais isolados. No mesmo levantamento o envolvimento de produtos de origem animal, como veiculadores dos agentes etiológicos, foi confirmado em 2118 (61%) dos casos identificados (BRASIL, 2011). As condições físicas, químicas e nutricionais oferecidas por esse tipo de alimento, favorecem a adaptação e multiplicação de microrganismos, o que os classificam como um risco a saúde coletiva quando processados de maneira inadequada (RISTOW, 2007; TRONCO, 2010).

A maioria dos casos de doenças alimentares não é notificada às autoridades sanitárias, e a omissão por profissionais da área de saúde ou mesmo pelas vítimas, prejudica o conhecimento epidemiológico das enfermidades (FORSYTHE, 2002). Consta, no artigo 2º da Portaria do Ministério da Saúde nº 1461 de 22 de dezembro de 1999, a obrigatoriedade de notificações de surtos de doenças alimentares no Brasil (BRASIL, 1999), no entanto, muitos dos casos no país não são identificados corretamente, limitando as informações em relação aos principais agentes etiológicos e alimentos veiculadores (BRASIL, 2011).

As concentrações de agentes patogênicos em alimentos, responsáveis por alterações patológicas em humanos, na maioria dos casos são inferiores as necessárias para o início das alterações sensoriais e essa condição interfere na conscientização dos consumidores, que associam contaminação a alimentos degradados (ALMEIDA, 2011). Para ser considerado apto ao consumo humano, o alimento deve atender a padrões de identidade e qualidade pré-estabelecidos em relação aos aspectos higiênico-sanitários e nutricionais (BRASIL, 1997).

Em relação aos produtos de origem animal, deve-se preconizar condições de processamentos em conformidade com os padrões de boas práticas de fabricação, assim como armazenamento e conservação adequados (PRATES, 2010; SANGALETTI et al., 2009). Também é essencial que se tenha assistência técnica, realizada por profissionais capacitados, durante toda a vida do animal com manejo nutricional e terapêutico ideais para garantia de matéria prima de boa qualidade (GERMANO; GERMANO, 2010). Não é possível a eliminação completa dos microrganismos contaminantes presentes nos produtos de origem animal, no entanto a adoção de práticas adequadas de fabricação e de recursos tecnológicos auxilia no controle desses agentes a níveis mais seguros (ANDRADE, 2008). Entende-se por boas práticas os procedimentos utilizados para atingir padrões de identidade e qualidade de produtos, ou serviços na área de alimentos, cuja eficácia e efetividade sejam avaliadas por inspeção e ou investigação (BRASIL, 1993). Os seguimentos comerciais que desrespeitam essas exigências oferecem aos consumidores produtos de menor qualidade e comprometida inocuidade, como ocorre em produções e comercializações informais, desprovidas de acompanhamento profissional (ALMEIDA, 2011). Duarte et al. (2005) confirmaram que alimentos obtidos por processos artesanais têm grande possibilidade de se apresentarem contaminados devido ao uso de matérias primas de fontes não

seguras e ausência de sanificação nas fabricações. O termo artesanal empregado aos alimentos pode ser dubiamente interpretado, podendo ser associado a uma elaboração que preconize as características originais do produto, e por isso são empregados métodos tradicionais de processamento, ou a uma produção realizada por métodos rudimentares, isenta de maiores preocupações com a inocuidade.

No Brasil, a comercialização de alimentos em vias públicas ainda é comum, sendo as feiras-livres uma modalidade de mercado varejista ao ar livre, realizada semanalmente, organizada como serviço de utilidade pública voltado à distribuição local de gêneros alimentícios e outros produtos básicos (ALMEIDA, 2011). Porém, mesmo com o aumento da preocupação com a segurança dos alimentos esse tipo de comércio ainda é precariamente fiscalizado, sendo os produtos ofertados um risco à saúde dos consumidores (AMSON, 2005; PERESI, 2001). A presença de microrganismos patogênicos em alimentos comercializados informalmente é atestada em pesquisas realizadas em diferentes regiões do país (BRANT et al., 2007; GRANDI; ROSSI, 2007; SALOTTI et al., 2006; ZAFFARI et al., 2007).

#### 4.2 LEITE E DERIVADOS COMO VEICULADOR DE AGENTES PATOGÊNICOS.

Oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 1952), o leite é considerado um alimento de elevado valor biológico para o consumo humano devido à presença em sua composição de elementos como água, carboidratos, proteínas, gordura e sais minerais (CORTEZ; CORTEZ, 2008). Embora seja secretado estéril nos alvéolos mamários, o leite é suscetível a microrganismos contaminantes ainda no interior do úbere do animal. Durante o processo de ordenha o risco de contaminação é ainda maior devido à presença de agentes na parte externa do úbere e tetos, em equipamentos e utensílios e ainda no próprio manipulador responsável. Esta contaminação pode chegar a milhões de bactéria por mililitro do produto ordenhado, e conter microrganismos patogênicos e deteriorantes prejudiciais a sua qualidade e de seus derivados, assim como à saúde dos consumidores (BRITO; BRITO, 2001).

Brito e Brito (2001) relataram entre os principais fatores contribuintes para contaminação do leite, a presença de doenças no rebanho, a higienização precária de instalações e equipamentos nas propriedades, a má qualidade da água e o

acondiçãoamento e transporte em condições impróprias. A água utilizada em propriedades leiteiras, quando não potável, pode ser considerada fonte de contaminação para o produto ordenhado visto que é utilizada para a higienização de equipamentos e utensílios, hidratação e higiene dos animais (AMARAL et al., 2003; AMARAL et al., 2004). Os microrganismos patogênicos veiculados pelo leite e seus derivados, atingem por via oral o organismo dos consumidores (TRABULSI, 2008). Entre surtos alimentares ocorridos e identificados no Brasil entre os anos 2000 e 2011, apresentados pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, 350 (16,5%) foram associados ao leite e a seus derivados (BRASIL, 2011).

O sistema circulatório dos mamíferos é o responsável pela irrigação das glândulas mamárias, logo as alterações recorrentes no organismos dos animais influenciam diretamente no produto secretado. Elevadas concentrações de proteínas, quando fornecidos a rebanhos leiteiros para o aumento da produção, predispõem as glândulas mamárias a processos inflamatórios. Além disso, tratamentos terapêuticos aos quais os animais são submetidos podem acarretar na presença de agentes químicos no leite fluido e também na resistência dos microrganismos veiculados, dificultando o controle das inflamações das glândulas mamárias (NASCIMENTO, 2001; VAN SCHAİK, 2002).

A mastite é uma das enfermidades mais importantes no rebanho leiteiro, capaz de determinar consideráveis perdas econômicas pela redução da qualidade do leite e pela possibilidade de perda da capacidade secretora (CORTEZ; CORTEZ, 2008). A enfermidade no animal também compromete a saúde coletiva visto que têm como principais agentes etiológicos bactérias patogênicas ao homem (MEDEIROS; SOUZA, 2009). Entre aos principais agentes responsáveis por inflamações das glândulas mamárias dos rebanhos leiteiros destaca-se o *S. aureus*, variando sua prevalência entre 7 e 40% nos rebanhos afetados. Outras espécies de microrganismos, em menor frequência, já foram isoladas de leite mastítico e entre elas *E. coli* e *Pasteurella multocida* (GERMANO; GERMANO, 2010).

Para minimizar as contaminações presentes no leite cru, a indústria dispõe de recursos tecnológicos que permitem produções seguras aos consumidores. A pasteurização, embora insuficiente para garantir a inocuidade dos derivados lácteos, segundo Oliver et al. (2005), minimiza a carga microbiana no material fluido. Porém, em determinadas produções artesanais o tratamento térmico não é realizado, seja para manter a originalidade do produto, seja pela precariedade em infraestrutura

(FEITOSA et al., 2003). Quando em elevadas concentrações no leite, certos microrganismos produzem substâncias tóxicas e deteriorantes que por serem termoestáveis, não são destruídas na pasteurização. Quando o tratamento térmico não é realizado, ou o é de maneira inadequada, as substâncias tóxicas apresentam-se em maiores concentrações visto que há uma relação direta entre sua produção e as concentrações dos microrganismos, mais elevadas em leite cru (FORSYTHE, 2002).

### 4.3 QUEIJOS

O queijo, além de preservar o valor nutricional do leite aumentando o prazo comercial, é um produto mais estável, palatável e adaptado às necessidades do mercado, sendo recomendado em dietas de todas as faixas etárias (CORTEZ; CORTEZ, 2008). Esse derivado lácteo é o mais difundido em todo o mundo, e embora tenha um conceito de fabricação comum, a origem da matéria fluida e diferentes técnicas aplicadas em seu processamento, possibilitaram o surgimento de aproximadamente 2.000 tipos de variações (JUNQUEIRA, 2008).

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado obtido por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1952).

Durante o processo de fabricação de queijos têm-se vários pontos considerados críticos para a garantia da inocuidade do produto final. Para o preparo desses derivados, a matéria prima deve ser obtida em condições higiênico-sanitárias ideais e conservada em local apropriado até o seu beneficiamento, as instalações e equipamentos devem ser higienizados corretamente além de se ter comprovada a saúde dos manipuladores (ANDRÉ, 2006).

Nas produções de queijos, consideram-se as duas denominações para artesanal uma vez que se têm elaborações cuja finalidade é assegurar as características originais do produto, e para tal é realizada em conformidade com as

legislações vigentes e comercializada formalmente, e produções cujas preocupações com higiene e inocuidade são desprezadas, sendo realizadas de maneira rudimentar e na informalidade (SEBRAE, 2008). Embora haja divergências entre os fabricantes, os consumidores têm esses produtos como sendo de qualidade e de maior valor nutritivo, o que garante à comercialização informal consumidores fiéis e descrentes do risco envolvido (ALMEIDA, 2011).

#### 4.4 QUEIJOS NO BRASIL

Foi em Salvador, em 1581, que jesuítas fabricaram o primeiro queijo no Brasil, utilizando como principais ingredientes, leite ordenhado de animais trazidos de Cabo Verde e o coalho oriundo de vísceras de animais abatidos. Porém foi no Estado de Minas Gerais, no século XIX que surgiram as primeiras queijarias, em consequência do desenvolvimento local e migração durante o ciclo do ouro, que atraía aventureiros de todo o território nacional e da Europa. O primeiro movimento industrial do país, influenciado pelo médico Carlos Sá, proporcionou modernização das queijarias, com maquinários modernos e técnicos europeus. Também foi Carlos o responsável, em 1888, pelo registro do primeiro rótulo de queijo no arquivo nacional (LEANDRO, 2008).

Entre os anos 2000 e 2008 o consumo *per capita* de queijos, no Brasil, cresceu 30,8%, passando de 2,6 kg para 4,4 kg/habitante/ano, com aumento gradual nos anos de 2009 e 2010 (FILHO; POMBO, 2010). No entanto, os dados sobre o consumo de queijos no país são contestáveis devido à pulverização do setor. Os valores em relação ao consumo e produção poderiam ser mais representativos, porém o número de pequenos e micro laticínios que atuam regionalmente e fora do âmbito do Serviço de Inspeção do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), dificulta a obtenção de informações oficiais, não sendo possível um registro do que é produzido informalmente (SEBRAE, 2008). Conforme especialistas da Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ) as produções industriais representam aproximadamente 60% do total de queijos fabricados no país, sendo o restante atribuído ao mercado informal com pequenos produtores e empresas não cadastradas, cujas produções são basicamente artesanais.

Em 2009, produziu-se no Brasil, que tem a elaboração de queijos como uma das mais importantes atividades na indústria de laticínios, cerca de 700 mil toneladas do produto, sendo as variedades mais fabricadas: muçarela, prato, requeijão e queijo minas frescal (FILHO;POMBO, 2010).

#### 4.5 QUEIJO MINAS FRESCAL

Considerado o único genuinamente brasileiro, o queijo minas frescal é um produto de grande aceitação no mercado, elaboração simples e alto rendimento, o que atrai o interesse de indústrias e pequenos produtores (CHALITA, 2009). Caracterizado pela produção artesanal, com leite cru, em propriedades mineiras, foi adaptado à indústria com utilização de leite pasteurizado e partir de 1980, sua produção no país aumentou significativamente, atraída por investidores que visavam retorno econômico acelerado, tornando o produto um dos derivados mais fabricados, superando outros lácteos (GERMANO; GREMANO, 2010).

Definido como fresco, obtido por coagulação parcial enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com a ação de bactérias lácticas específicas, o queijo minas frescal é classificado como semi-gordo e de muita alta umidade (55%), sendo uma variedade não maturada e de reduzida validade comercial (BRASIL, 1996; BRASIL, 2001; BRASIL, 2004). Os principais constituintes do queijo minas frescal (água, gordura, proteínas, lactose, ácido láctico, cloreto de sódio e sais) influenciam nas características organolépticas do produto, como a coloração, maciez, sabor e odor (ORDÓÑEZ, 2005). Comercializado na forma cilíndrica, com peso entre 0,5 e 3 Kg, esse derivado lácteo apresenta massa crua, de coloração esbranquiçada, teor de sal entre 1,4% e 1,6% (SILVA; SILVA, 2005). Em relação ao pH, Furtado (2005) considerou uma variação normal entre 5,1 e 6,6.

As mesmas propriedades que classificam os queijos minas frescal como um alimento nutritivo, colaboram na adaptação e multiplicação de microrganismos contaminantes, sejam deteriorantes ou patogênicos (CÂMARA et al., 2002). Embora seja obrigatória a pasteurização do leite para a elaboração de queijos cuja maturação não exceda 60 dias, é comum em produções informais de queijos minas frescal a coagulação do leite sem tratamento térmico prévio (FEITOSA et al., 2003).

Vasconcelos (2006) revelou que a contaminação de queijos fabricados com leite cru é agravada principalmente quando ordenhado precariamente, na ausência de higienização adequada.

Quando fabricado artesanalmente, por pessoas não treinadas o queijo minas frescal é exposto à contaminação por microrganismos, comprometendo sua qualidade e a segurança de seus consumidores. As produções e comercializações informais são encontradas em todo o país e, na maioria dos casos, em condições precárias de higiene e veiculando agentes patogênicos (ROCHA et al.2006). As embalagens utilizadas para o isolamento do produto quando não apropriadas, influenciam na concentração de agentes contaminantes (TEPELLI, 2006).

Assumpção et al. (2003) afirmaram que a manipulação, necessária durante a fabricação de derivados lácteos, quando realizada por profissionais não saudáveis ou de forma inadequada pode acarretar em elevadas contaminações dos produtos, mesmo após o tratamento térmico da matéria fluida. Segundo Andrade (2008), a higienização completa, principalmente de mãos e antebraços dos manipuladores, evita recontaminação do leite pasteurizado ou elevação da concentração de microrganismos presentes no leite cru.

Salotti et al. (2006) comprovaram a suscetibilidade dos queijo minas frescal à contaminação, em estudo realizado em Jaboticabal- SP, após confirmarem a presença de agentes patogênicos em 100% das amostras analisadas. Para Soto (2009) uma fiscalização orientada aos produtores e comerciantes pode garantir a qualidade dos alimentos.

Constam na RDC N°12 (BRASIL, 2001), os limites de contagem e presença dos principais microrganismos associados ao queijo minas frescal, exigidos para que o produto seja considerado próprio ao consumo humano. Em relação aos microrganismos coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva exige-se contagens inferiores a  $5,0 \times 10^2$  UFC/g para exemplares sem a ação de bactérias lácticas e  $5,0 \times 10^3$  UFC/g, quando estas estão presentes em abundância. Em relação à *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., é exigido a ausência dos agentes em 25g da amostra.

#### 4.5.1 Coliformes

Identificadas na família Enterobacteriaceae, as bactérias dos grupos dos coliformes totais e termotolerantes, considerados coliformes 35°C e 45°C, são comumente associadas à deterioração de queijos causando fermentações anormais e estufamento precoce. A contaminação de queijos por estes microrganismos em pesquisas nacionais merece destaque, por revelarem precariedade nas condições higiênicas e a possível presença de agentes patogênicos (ALMEIDA FILHO; NADER FILHO, 2002).

Os coliformes termotolerantes são microrganismos presentes no ambiente, no trato gastrointestinal de homens e animais e são diferenciados das demais bactérias do grupo coliformes por apresentarem a capacidade de fermentar a lactose a 44,5°C  $\pm$  0,5°C, produzindo ácido e gás. Embora algumas cepas de *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. apresentem esta característica, *E. coli* é a espécie do grupo considerada o melhor indicador de contaminação fecal, por ser a única que apresenta o trato gastrointestinal como habitat primário (SOUSA, 2006.).

Diversos relatos indicaram que queijos minas frescal comercializados no Brasil são amplamente contaminados, confirmando a ausência de boas práticas e utilização de matéria prima de baixa qualidade na fabricação dos derivados seja na indústria ou em produções artesanais (ARAUJO et al. 2002; VILELA et al., 2001). Quando avaliada a qualidade microbiológica de queijos comercializados no estado do Rio Grande do Sul, Zaffari et al. (2007) constataram a presença de coliformes termotolerantes acima dos padrões preconizados em legislação, em 84% dos produtos analisados.

#### 4.5.1.1 *Escherichia coli*.

*E. coli* foi reconhecida como patógeno alimentar, em 1971, após ser encontrada em queijos comercializados em estados norte americanos, provocando gastroenterites entre os consumidores do produto (JAY, 2005). A presença da bactéria está associada à contaminação do alimento por conteúdo fecal e representa um risco, pois causa infecções graves, podendo levar o paciente a óbito. Embora seja uma única espécie, possui inúmeros tipos antigênicos, cuja colonização das células intestinais tem como consequência a produção de toxinas responsáveis por comprometer a saúde dos indivíduos infectados. A intensidade da injúria provocada

por esse microrganismo depende da estirpe infectante, da quantidade ingerida, e das condições imunológicas do infectado (GERMANO; GERMANO, 2010).

*E. coli* pode ser classificada como comensal ou patogênica. As estirpes dos grupos denominados comensais adaptam-se passivamente no intestino de humanos sem causar doenças, sendo a maioria deficientes de fatores de virulência (TRABULSI, 2008). Em relação as *E. coli* patogênicas, que apresentam riscos à saúde humana, têm-se a distinção dos grupos baseada na sintomatologia apresentada por vítimas do microrganismo, sendo os de maior importância patogênica classificados como: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasoras (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* enteroagregativas (EAaggEC) (JAY, 2005).

A possibilidade dos indivíduos infectados eliminarem nas fezes a *E. coli*, aumenta o risco de contaminação de materiais, solo, água e, conseqüentemente, dos alimentos, durante ou após o processamento, caso haja algum descuido em relação a higiene durante a manipulação (BARRETO et al., 2012; CAMPOS et al., 2006). Carneiro (2008) relatou elevadas concentrações do patógeno *E. coli* em manipuladores de alimentos mesmo após a higienização das mãos, enquanto Amaral et al. (2004) isolaram a bactéria em amostras de água utilizadas na higienização de instalações de uma propriedade leiteira.

O leite cru é uma via de transmissão importante do patógeno, principalmente quando recebe tratamento térmico inadequado. *E. coli* não apresenta resistência a temperaturas elevadas, sendo sensível a faixa de 60°C em poucos segundos, porém pode resistir por longos períodos quando em temperatura de refrigeração (SILVA et al., 2010). A confirmação da bactéria em queijos tem sido relatada em pesquisas em diferentes regiões do país confirmando ser este tipo de derivado lácteo um possível veiculador do patógeno. Quando avaliada a qualidade bacteriológica de queijos artesanais no Estado do Rio Grande do Sul, Feitosa et al. (2003) isolaram a *E. coli* em 7,7% das amostras pesquisadas, enquanto que na região centro oeste do país Paneto et al. (2007) isolaram a bactéria em 48 (96%) amostras dentre as 50 analisadas, fabricadas com leite não pasteurizado.

#### **4.5.2 *Staphylococcus coagulase positiva***

O gênero *Staphylococcus* é constituído por bactérias do tipo cocos, que podem apresentar-se individualmente, em pares ou em tétrades, formando grupamentos irregulares semelhantes a cachos de uva. São bactérias Gram-positivas imóveis, catalase positivo, anaeróbios facultativos e resistem a altas concentrações salinas (10% - 20%). As espécies *Staphylococcus intermedius*, *S. hydicus* e *S. aureus* são as principais espécies do gênero capazes de produzir enzimas coagulase e enterotoxinas termorresistentes, sendo consideradas agentes etiológicos de interesse para a indústria alimentícia (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Algumas espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa também produzem enterotoxinas (CUNHA et al., 2007; VERAS et al., 2008), e embora tenha aumentado a veiculação dessa espécie em alimentos, são menos relatadas em casos de surtos alimentares (JAY, 2005). Na legislação brasileira ainda é exigida a pesquisa de *Staphylococcus* coagulase negativa para condenar ou não um alimento ao consumo humano.

A intoxicação alimentar causada por *Staphylococcus* coagulase positiva ocorre após a ingestão do alimento com a toxina pré-formada e a produção desta substância nociva aos humanos está associada à concentração da bactéria presente no alimento. Embora a produção de toxina ocorra em todas as fases de crescimento do microrganismo, quantidade da substância suficiente para intoxicação de humanos estão presentes segundo Forsythe (2002), em concentrações maiores da bactéria como partir de  $10^5$ UFC/g, porém alguns autores já associaram surtos alimentares à concentrações menores do agente (VERAS, 2003).

Entre as espécies do gênero, a mais isolada em casos de surtos alimentares é *S. aureus*, classificado como a mais patogênica entre as espécies coagulase positiva. Os seres humanos e os animais são os principais reservatórios de *S. aureus*, sendo a cavidade nasal seu principal habitat, podendo ser encontrado em indivíduos saudáveis (MENEGOTTO; PICOLI, 2007; WONG; BERGDOLL, 2002). É a partir da cavidade nasal que o microrganismo atinge a epiderme, ar, água, solo, alimentos ou qualquer outro objeto que entre em contato com o indivíduo (FRANCO; LANDGRAF, 2003; GRANDO et al., 2008).

*Staphylococcus* são os principais agentes causadores de mastite, sendo os patógenos mais isolados em leite cru ordenhado de animais com essa enfermidade (MEDEIROS; SOUZA, 2009; OLIVEIRA et al, 2002). Esta contaminação do leite pode comprometer a inocuidade dos produtos derivados, uma vez que as toxinas

resistem a tratamentos térmicos aos quais à matéria prima é submetida (PINTO et al., 2011; SILVA et al., 2000).

Loguercio e Aleixo, (2001), ao avaliarem a qualidade microbiológica de queijos minas frescal produzidos artesanalmente na cidade de Cuiabá MT, constataram que 96,6% das 30 amostras analisadas estavam em desacordo com a legislação vigente. Destacam-se também as avaliações realizadas por Salotti et al., (2006) onde confirmaram 30% das 60 amostras avaliadas, positivas para *Staphylococcus coagulase* positiva.

Amaral et al. (2004) relataram o possível envolvimento da água de propriedades leiteiras como fonte de contaminação por *S. aureus* podendo ser responsabilizada tanto pelo processo inflamatório das glândulas mamárias dos animais a mastite quanto pela contaminação direta do leite. Langoni et. al (2006) constataram os *Staphylococcus coagulase* positivas como os principais agentes causadores de mastite subclínica, destacando os *S. epidermidis* e *S. aureus* entre os mais isolados entre 124 amostras de leite analisadas em propriedades destinadas a caprinocultura.

#### **4.5.3 *Salmonella* spp.**

Microrganismo da família Enterobacteriaceae, *Salmonella* spp. é um dos principais agentes de doenças de origem alimentar no mundo, inclusive no Brasil (BRASIL, 2011; TRABULSI, 2008). Entre os agentes patogênicos identificados em surtos alimentares no país entre os anos de 2000 e 2011, foram relatados 1660 (42,2%) casos de *Salmonella* spp.(BRASIL, 2011). A bactéria se apresenta como bastonetes Gram-negativos, geralmente móveis, e crescem a temperaturas entre 5°C e 47°C (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Segundo Oliveira (2003), a salmonelose é uma das doenças infecciosas mais problemáticas à saúde coletiva em função de sua endemicidade, morbidade e difícil controle. *Salmonella* spp. estão distribuídas na natureza, porém têm o trato gastrointestinal dos humanos e dos animais como habitat primário. Agente da febre tifoide, a *Salmonella* Thyphy é um dos sorovares mais importantes, além de *Salmonella* Typhimurium, responsável por inúmeros relatos de surto alimentares relatados na literatura (ALVES; PINHEIRO, 2007).

O envolvimento de bactérias do gênero em derivados lácteos tem sido relatado em diferentes estados do país, principalmente em alimentos de produção artesanal, nos quais presença do agente patogênico é associada à precariedade na higienização durante a fabricação do produto (PEREIRA et al. 1999). Feitosa et al. (2003), ao avaliarem a qualidade microbiológica de 23 amostras de derivados lácteos no estado do Rio Grande do Norte constataram a presença de *Salmonella* spp. em 3 % dos exemplares, enquanto Duarte et al. (2005) isolaram, no estado de Pernambuco, o microrganismo em 5,5% das 127 amostras testadas.

#### **4.5.4 *Listeria* spp.**

Embora isolado desde 1926, o microrganismo *Listeria* spp. foi considerado um agente etiológico veiculado a alimentos na década de 80. A ingestão dos alimentos contaminados pode causar em humanos a listeriose, doença caracterizada por gastroenterite, porém em casos mais graves pode provocar meningite, meningoencefalite e sepse. Em grupos de risco, como imunossuprimidos, neonatos, idosos e gestantes, a listeriose pode ser letal e, apesar de atingir um grupo reduzido de pessoas, pode apresentar taxa de mortalidade entre 20 e 40% (MCLAUCHLIN et al., 2004).

Este microrganismo se apresenta como pequenos bastonetes Gram-positivos não esporogênicos e são considerados psicotróficos, devido sua capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração, podendo também resistir ao congelamento (GASANOV, 2005; JAY, 2005). As espécies desse gênero são imóveis quando crescem em temperaturas de 35°C, mas apresentam motilidade característica a temperaturas de 25°C, e possuem a capacidade de fermentar glicose e outros carboidratos com produção de ácido, mas sem produção de gás (RYSER; DONNELLY, 2001).

O Gênero *Listeria* é constituído por seis espécies, sendo *L. monocytogenes* a mais importante em saúde coletiva, devido seu alto risco patogênico ao ser humano. As espécies *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii* podem também apresentar efeitos patogênicos, porém os relatos são raros (GERMANO; GERMANO, 2010). *Listeria* spp. são distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em vegetação deteriorada, solos, fezes de animais, silagem, esgotos e águas (JAY, 2005). Segundo Germano e Germano (2010), 1 a 10% dos seres

humanos são portadores assintomáticos de *L. monocytogenes* no intestino, também encontradas em 37 espécies de mamíferos e 17 espécies de aves.

Os alimentos frescos de origem animal podem apresentar números variados deste microrganismo e, embora a dose infectante seja desconhecida, tem-se que 100 organismos presentes em leite cru ou pasteurizado sejam o suficiente para causar a doença em grupos de risco. A presença do microrganismo em silagens e como causador de mastite confirma a possível veiculação deste agente pelo leite (GERMANO; GERMANO, 2010).

As bactérias do gênero *Listeria* spp. são sensíveis e pouco competitivas sendo sua adaptação ao meio prejudicada pela presença de outros microrganismos, assim como das condições físico-químicas do alimento (JANTZEN et al. 2006; VLAEMYNCK; MOERMANS, 1996). Embora a presença de *Listeria* spp. possa ser limitada por bactérias naturais do leite, casos de listeriose envolvendo queijos e outros derivados lácteos como principais veiculadores do microrganismo evidencia a importância desses alimentos na cadeia epidemiológica da doença (BORGES et al., 2003; CARVALHO et al., 2005; CATÃO; CEBALLOS, 2001; GUERRA; BERNARDO, 2005). Silva et al. (1998) ao avaliarem a presença de *Listeria* spp. em diferentes tipos de queijos, relataram 11(11,68%) exemplares positivos para *L. monocytogenes*, 13 (12,62%) por *L. innocua* e 6 (5,83%) e 1(0,97%) contaminados por *L. gravi* e *L. welshimeri*, respectivamente.

#### 4.6 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos é conhecida desde que foram utilizadas as primeiras substâncias quimioterápicas, antes mesmo do início do uso clínico de sulfonamidas e penicilinas nos anos de 1933 e 1941, respectivamente (TRABULSI, 2008). Ao descobrir a penicilina, em 1929, Fleming observou a ineficiência da substância em alguns microrganismos, o que está relacionado às características naturais de algumas bactérias (FLEMING, 1929).

A resistência dos microrganismos aos antimicrobianos é natural, considerada um fenômeno genético, devido à presença de genes capazes de codificar diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação dos fármacos (LI et al., 2007). Os microrganismos produtores de antimicrobianos apresentam mecanismos de

autoproteção em relação as suas substâncias. Há também a resistência adquirida, devido à mutação e à capacidade de certas estirpes transferirem, por meio de mecanismos de transdução, transformação e conjugação, envolvendo plasmídeos e transposons, os genes responsáveis pela resistência, que pode se estabelecer entre microrganismos de diferentes populações, como da microbiota animal para a humana ou ao contrário (NIJESTEN, 1993; TRABULSI, 2008).

A partir de 1950 os antimicrobianos foram amplamente distribuídos e indiscriminadamente utilizados em clínicas humana e veterinária, em indústrias, como conservantes de alimentos ou ainda comercialmente, como promotores de crescimento na criação de animais (TRABULSI, 2008). Essa utilização teve como consequência o aumento da resistência antimicrobiana, que desde então representa importância considerável para saúde pública (APPELBAUM, 2007; BARRETO, 2007; DROPA, 2006; HARAKEN et al., 2009; HOF, 2003). O uso de antimicrobianos seleciona os microrganismos mais resistentes e a transferência dessa informação garante a resistência das estirpes bacterianas, mesmo sem exposição prévia à substância (NAWAZ, 2002; TAVARES, 2000).

A ingestão de alimentos contaminados pode acarretar, também, em uma maior resistência das bactérias naturais da microbiota intestinal do infectado, uma vez que os microrganismos resistentes presentes no alimento, ao atingirem o trato gastrointestinal, terão a possibilidade de transferirem genes responsáveis por determinada característica (BYARUGABA, 2004). A resistência de bactérias presentes no alimento é influenciada pelo seu processamento (PERESI et al, 2006). Em produtos de origem animal, todo o manejo ao qual o indivíduo fornecedor de alimento é submetido, como alimentação e tratamentos quimioterápicos é importante, assim como a higienização, sanitização, e manipulação durante o processamento da matéria prima.

O leite e seus derivados possuem algumas substâncias antimicrobianas como lactoferrina, conglutinina e lactoperoxidase. Durante a síntese do leite, condições como a utilização de promotores de crescimento e quimioterápicos casuais, podem influenciar na resistência dos agentes veiculados, porém a utilização de antimicrobianos em tratamentos de mastite é a principal causa dessa resistência (ANDREOTTI; NICODEMO, 2004).

Ao avaliar a sensibilidade antimicrobiana de cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de leite oriundas de animais mastíticos Freitas et al. (2005), constataram

que seis dos nove antibióticos testados não foram eficientes. Langoni et al., (2006), avaliaram a susceptibilidade dos principais agentes responsáveis pela mastite e constatou que todas as estirpes eram resistentes a no mínimo um dos fármacos, destacando a resistência de 75% dos *S. aureus* isolados à penicilina e a ação eficiente da gentamicina em 93, 7% das estirpes. Estudos que tratam da susceptibilidade de patógenos responsáveis pela mastite bovina, no Brasil, apontam o aumento crescente no padrão de resistência (BRITO; BRITO, 2001)

O desenvolvimento da resistência por certas bactérias é mais rápido que a capacidade da indústria para produção de novos fármacos, sendo importante que análises de sensibilidade antimicrobiana *in vitro sejam* consideradas pelos proprietários antes da escolha do tratamento, para que esse seja mais eficiente. Estes estudos também auxiliam as indústrias na fabricação de medicamentos mais eficazes para o tratamento de doenças nos seres humanos (MADIGAN, 2010; McCALLUM,2010).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 MATERIAL

O material utilizado durante a realização das análises foi descrito durante a abordagem das metodologias aplicadas.

### 5.2 MÉTODOS

#### 5.2.1 Colheita e Identificação das amostras

Adquiriram-se 60 amostras de queijo em 10 pontos (boxes) de comercialização, situados na feria livre dominical da cidade de Volta Redonda. Foram realizadas, quinzenalmente, entre os meses de dezembro de 2011 e fevereiro de 2012, seis colheitas compostas por 10 queijos inteiros cada, sendo um de cada boxe (Figura 1).



**Figura 1:** Boxes de comercialização de produtos de origem animal em feiras livres na cidade de Volta Redonda- RJ.

O número de amostras analisadas foi baseado nas exigências de representatividade do método descrito por Di Giacomo e Koespsell (1986) com base na prevalência estimada entre 5% e 10%, encontrada em trabalhos semelhantes, para o microrganismo *L. monocytogenes*, cujo percentual de isolamento é o menor entre os agentes pesquisados (SILVA et al, 1998)

Embora apresentassem embalagens próprias, os exemplares foram alocados em embalagens secundárias de plástico de polietileno após a aferição da temperatura, e lacradas com abraçadeiras de plástico. As embalagens secundárias tinham como finalidade evitar a contaminação cruzada, durante o transporte ao local de análise. A identificação das amostras foi realizada com uma letra seguida de um número, representando o dia e o ponto de colheita, respectivamente.

### **5.2.2 Transporte**

Após a identificação, as amostras foram armazenadas em caixas isotérmicas em cujo interior continha gelo industrializado, tipo gel, além de termômetro de ambiente para avaliação da temperatura. Devidamente lacrada, a caixa de transporte foi encaminhada ao Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, localizado no município de Niterói RJ.

As amostras eram mantidas em temperatura inferior a 4°C até o momento das análises, realizadas em um período inferior a 24 horas, respeitando os limites estabelecidos por Midura e Bryant (2001).

### **5.2.3 Preparo das subamostras para procedimento analítico**

As amostras foram preparadas conforme consta no anexo V da IN N°62 (BRASIL, 2003). As análises foram realizadas no interior de câmara asséptica, sobre bancada de material inoxidável devidamente higienizada e sanitizada, com álcool 70%, e após ser submetida à ação de luz ultravioleta por no mínimo de 15 minutos (Figura 2).



**Figura 2:** Câmara asséptica preparada para as análises bacteriológicas.

Material como tesoura, pinças e bisturi, e as amostras foram manipuladas na zona de proteção fornecida pela chama do bico de Bunsen, presente na bancada. As alíquotas necessárias para as análises foram compostas por fragmentos de áreas distintas das amostras, a fim de se obter maior representatividade do produto. Para a pesagem e homogeneização foram utilizados, respectivamente, balança de precisão digital (Martec® LC1) e homogeneizador “Stomacher”( Seward® 80).

As amostras foram submetidas às seguintes análises bacteriológicas: contagem de coliformes totais, contagem de coliformes termotolerantes com pesquisa de *E. coli*, contagem de *E. coli*, contagem e isolamento de *Staphylococcus* coagulase positiva, Pesquisa de *Salmonella* spp. e Pesquisa de *Listeria* spp. com identificação de espécies. Para as análise de coliformes e *Staphylococcus* spp., eram adicionados 25 g da amostra em 225ml de Solução Salina Peptonada 0,1%(SSP 0,1%), obtendo-se a diluição  $10^{-1}$  da amostra. Com auxílio de um pipetador automático, coletava-se, a partir da diluição preparada, 1 ml para ser adicionado em tubo contendo 9ml da mesma solução, garantindo a diluição  $10^{-2}$ . Fez o mesmo procedimento para o preparo das demais diluições necessárias, sempre a partir de 1 ml da diluição antecedente.

Todo o material de cultivo utilizado durante a pesquisa foi preparado de acordo com as recomendações dos fabricantes, sendo esterilizados em autoclave, quando necessário, assim como os tubos de vidro. Os instrumentos como agulha, alça de platina, bisturi, entre outros, antes de utilizados, foram sanitizados e flambados ao rubro em bico de Bunsen.

## 5.3 ANÁLISES

### 5.3.1 Análises Físico-Químicas

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Controle Físico-químico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, localizada em Niterói-RJ.

#### 5.3.1.1 Umidade

Para as aferições de umidade realizou-se a metodologia por radiação de luz infravermelha, e para tal utilizou-se o equipamento de secagem por Radiação Infravermelha (LJ16 METTLER TOLEDO®). Após macerar aproximadamente cinco gramas da amostra, essa foi adicionada de forma homogênea sobre a superfície de uma pequena bandeja de alumínio, que era alocada no aparelho sob a ação da radiação. O valor da umidade era apresentado no display, na região frontal do aparelho, aproximadamente após 30 minutos.

#### 5.3.1.2 pH

As aferições de pH seguiram os procedimentos presentes na Instrução Normativa N°68 (BRASIL, 2006). Após pesados aproximados 10g da amostra, adicionava-se água destilada até formar uma massa homogênea, na qual era submersa o eletrodo do peagômetro digital (CapLab® modelo PG1800). Os resultados de cada amostra foram obtidos com a média de três subseqüentes aferições.

#### 5.3.1.3 Temperatura

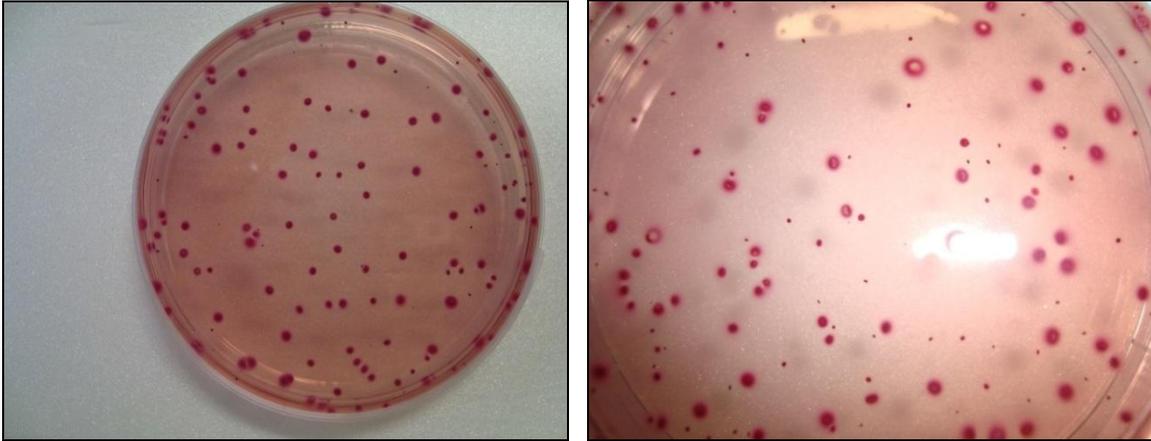
As aferições de temperatura foram realizadas com termômetro digital tipo espeto, próprio para alimentos, no momento da aquisição das amostras.

### 5.3.2 Análises Bacteriológicas

#### 5.3.2.1 Contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes.

As análises para contagem de coliforme totais e coliformes termotolerantes foram realizadas conforme a IN N°62 (BRASIL, 2003). Para todas as amostras prepararam-se diluições entre  $10^{-1}$  e  $10^{-9}$ . Alíquotas de 1 ml de cada diluição foram adicionadas em placas de Petri descartáveis, estéreis e devidamente identificadas, de acordo com a amostra e diluição avaliadas. Sobre a alíquota era adicionado Violeta Red Bile Agar- VRBA (HIMEDIA M049), cobrindo o fundo da placa, que em seguida era movimentada para a homogeneização da amostra ao meio. Preconizava-se que a temperatura do meio fosse de aproximadamente  $45^{\circ}\text{C}$ , para evitar injúrias aos microrganismos. Aproximadamente 20 segundos após a homogeneização, uma nova camada de VRBA era acrescentada sobre a primeira camada solidificada. A dupla camada do meio garante a anaerobiose parcial além de prevenir o crescimento de colônias na superfície do ágar. Para a manutenção do meio em estado líquido, este era mantido em banho-maria, durante as análises.

Depois de solidificada a segunda camada, as placas foram armazenadas em estufas a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por um período de 24h para então serem observados o crescimento e características das colônias. O resultado final foi dado pela contagem das colônias na placa de maior diluição que apresentasse número de colônias entre 15 e 150. O meio VRBA apresenta, em sua composição, sais biliares e cristal violeta, que inibem o crescimento de microrganismos Gram-positivos, além de conter o vermelho neutro, responsável por indicar a fermentação da lactose. As colônias características de coliformes apresentam, no VRBA, coloração rosa e tamanhos entre 0,5-2,0 mm podendo ter, ou não, halo de precipitação (Figura 3).



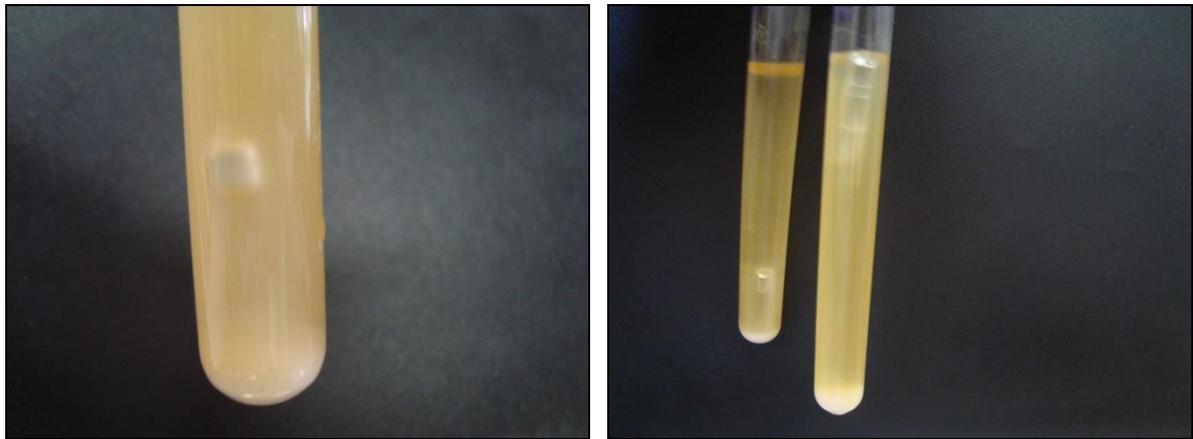
**Figura 3:** Colônias com crescimento característico de Coliformes em meio VRBA.

A confirmação de coliformes totais e termotolerantes foram realizadas a partir de colônias características inoculadas em caldos seletivos. Cinco colônias características, presentes na placa escolhida para a contagem, foram selecionadas com o auxílio de uma agulha, e em seguida repicadas em caldos presentes em tubos 16X160 mm com tampas de baquelite. Uma mesma colônia foi repicada em Caldo Verde Brilhante Bile 2% Lactose-VBBL (HIMEDIA, M121) e em seguida em Caldo *Escherichia Coli*-EC (FLUKA, 44635). Os tubos, além de conter 10 ml dos respectivos caldos, apresentavam em seu interior um tubo de Durham invertido, para auxiliar na visualização da formação do gás. Depois de repicadas as colônias, os tubos com Caldo VBBL foram incubados em estufa a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48h, enquanto que os tubos contendo Caldo EC foram incubados, em banho-maria, com agitação constante de água, regulada a  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , pelo mesmo período. A presença de bile bovina e do corante verde brilhante, presentes no Caldo VBBL, assim como os sais biliares na composição do Caldo EC, inibem o crescimento de microrganismos Gram-positivos. Após o período de incubação, foi observada a produção de gás no interior dos tubos. Os coliformes produzem gás como resultado da fermentação da lactose (Figura 4). A visualização de gás no interior dos tubos de Durham, ou mesmo nos Caldos de cultivo, após agitação dos tubos, indicam a prova como positiva.



**Figura 4:** Resultado positivo para Coliformes totais em Caldo VBBL, confirmado pela presença de gás no interior do tubo de Durham.

Os coliformes termotolerantes são os únicos, dentre os coliformes, a apresentarem atividade metabólica com consequente produção de gás em temperatura de  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . (Figura 5).

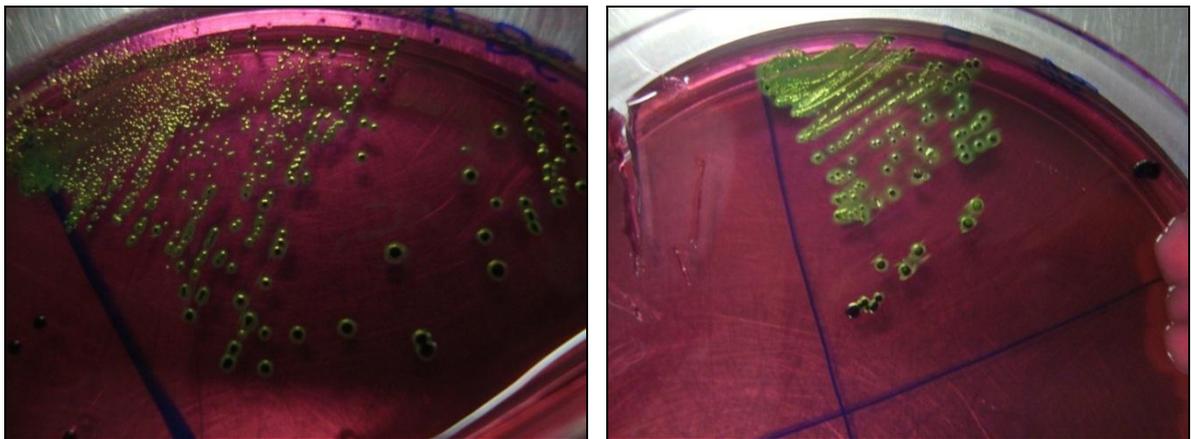


**Figura 5:** Resultado positivo para Coliformes termotolerantes em Caldo EC, confirmado pela presença de gás no interior do tubo de Durham.

Para obter o resultado final da contagem utilizou-se a fórmula presente nos anexos da IN N°62 (Quadro 2, ANEXOS). Foram consideradas positivas, colônias cujo cultivo apresentava formação de gás nítida.

### 5.3.2.2 Avaliação e Contagem de *E. coli*.

Para a verificação da presença e contagem de *E. coli* considerou-se a metodologia descrita por Kornacki e Johnson (2001). Os cultivos de cada tubo considerado positivo no Caldo EC foram estriados em Ágar Eozina Azul de Metileno-“Eosin Metilen Blue”-EMB, (HIMEDIA, 317), presente em placas de Petri. Após o estriamento, feito com o auxílio de alça de platina, as placas foram incubadas em estufa com temperatura a  $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 24h. O meio EMB é seletivo e diferencial, no isolamento e detecção de enterobactérias, apresentando em sua composição os corantes eosina e azul de metileno, que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas e proporcionam colorações típicas às colônias de microrganismos fermentadores de lactose: carboidrato presente na composição do meio. A acidificação do meio, consequente da fermentação da lactose, provoca uma reação da eosina proporcionando coloração típica à *E. coli*, que no meio EMB, apresenta crescimento plano, com centro escuro, podendo ou não apresentar brilho metálico esverdeado, característica usada para diferenciá-la dos outros coliformes (HAJDENWURCEL, 1998) (Figura 6).



**Figura 6:** Colônias com crescimento característico de *E. coli* em Ágar Eozina Azul de Metileno.

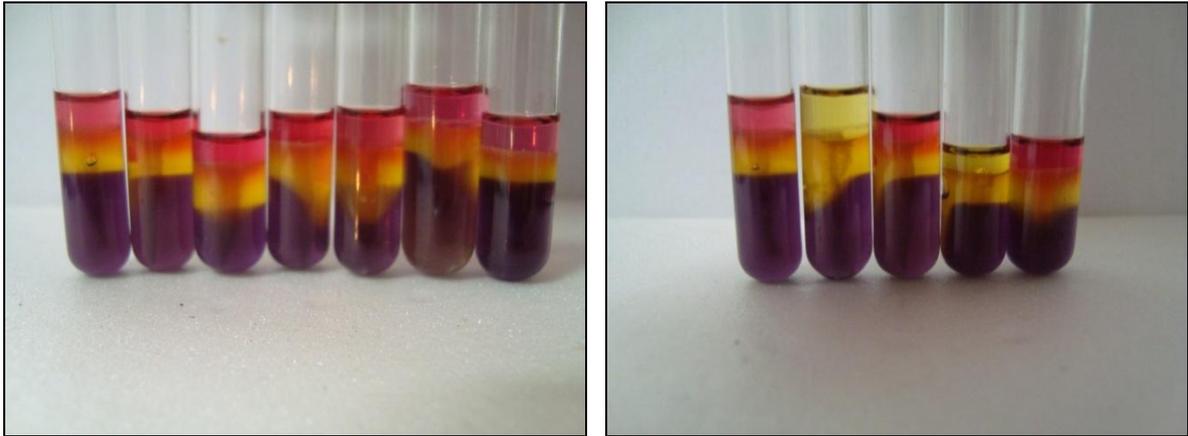
As colônias suspeitas foram selecionadas com agulha e estriadas em Ágar Nutriente (HIMEDIA, M091), presente em tubos 10x100 mm com tampa de baquelite, que foram incubados por 24h a temperatura de  $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ . O cultivo, após a

incubação, foi utilizado em provas bioquímicas confirmatórias, assim como para o preparo de esfregaços.

Como etapas para a confirmação das colônias foram realizados esfregaços a partir do cultivo em Ágar Nutriente (HIMEDIA, M091). Feito o esfregaço, em lâmina de vidro descartável, foi realizada a coloração pelo método de Gram, para avaliação morfotintorial das colônias. A *E. coli* apresenta-se como bastonete Gram-negativo. Ainda a partir do crescimento em Ágar Nutriente foram realizadas além da avaliação da motilidade, as provas bioquímicas: Produção do Indol, Teste de Vermelho de Metila e Voges-Proskauer e Citrato.

#### 5.3.2.2.1 Avaliação da produção do Indol e da Motilidade

O meio de cultura utilizado para realização das provas de motilidade e produção do indol foi o Motilidade Indol Lisina- MILI, (HIMEDIA, M847), que permite também a avaliação da Desaminação e Descarboxilação da Lisina. O MILI, presente em tubos, foi semeado com o cultivo das colônias suspeitas, em linha vertical, com o auxílio de uma agulha, e em seguida incubados a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24h. Após a incubação do meio, foram avaliados o crescimento e coloração característicos ou não de *E. coli*. Inicialmente foram observadas as linhas de repique do cultivo, considerando motilidade positiva os cultivos com crescimento difuso, e motilidade negativa quando limitado à linha central de repique. A avaliação de desaminação e descarboxilação foi observada por meio da coloração do meio. Considerava-se positivo para lisina descarboxilase os cultivos cujo meio permaneciam com coloração purpura após incubação. Meios com coloração avermelhada na porção superior foram considerados positivos para desaminação da lisina. Após as avaliações iniciais realizavam-se os testes de produção do indol, acrescentando cinco gotas de reativo de Kovac's sobre o meio. O teste do indol é considerado positivo quando surge um anel de coloração vermelha na superfície do meio após a adição do reativo (Figura 7). Estirpes de *E. coli* apresentam reações positivas para as provas de lisina descarboxilase e motilidade, e negativa para a prova de desaminação da lisina. Em relação às provas de indol podem se apresentar positivas ou negativas.



**Figura 7:** Resultado positivo para a prova do indol, após adição de reativo de Kovac's, confirmado pela coloração avermelhada do halo na superfície do meio MILI.

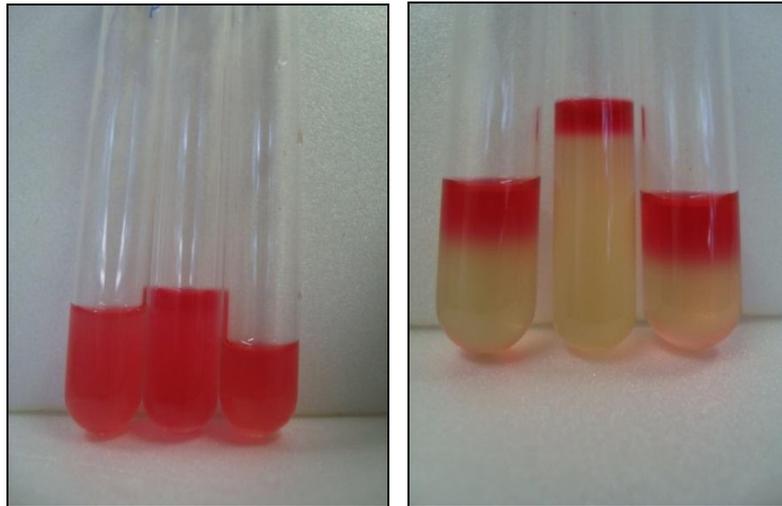
#### 5.3.2.2.2 *Teste de Vermelho de Metila e Voges-Proskauer*

Para avaliar a via fermentativa do microrganismo utilizou-se o Caldo MR/VP (HIMEDIA, M070). A partir do cultivo em Ágar Nutriente semeavam-se dois tubos contendo 3 ml, cada, de meio MR/VP. Os tubos foram incubados a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , sendo um por 48h, para a prova de Vermelho de Metila- VM e o segundo por 96h, para o teste de Voges-Proskauer- (VP).

Após 48h de incubação analisava-se a prova de VM, homogeneizando o meio após a adição de quatro gotas de vermelho de metila 0.06%. Caso a coloração do meio, originalmente amarelo, alterasse para avermelhado, a prova era considerada positiva. Nesta prova avalia-se a capacidade do microrganismo de oxidar a glicose do meio produzindo e mantendo elevada a acidez final. Alguns microrganismos intestinais, como a *E. coli*, conseguem manter o pH em aproximadamente 4,0 até o final do período da incubação, enquanto outros têm os metabólitos ácidos de oxidação convertidos em resíduos não ácidos antes do término da incubação. O indicador vermelho de fenol, presente no meio, altera a cor do meio quando há presença elevada de resíduos finais ácidos, pois o pH do seu ponto de viragem é baixo.

Para a realização da prova de VP foram adicionadas ao cultivo, que permaneceu incubado por 96h, duas gotas de alfa-naftol 5% e 0,2 ml de hidróxido de potássio 40%. Após a adição das substâncias, o tubo foi mantido em repouso por aproximadamente duas horas antes da leitura. Esta prova tem por objetivo detectar a capacidade dos microrganismos produzirem produtos finais não neutros após a

incubação. O acréscimo de determinados reagentes permite identificar, através da mudança de coloração do meio, o resíduo não ácido denominado acetilmetilcarbinol (acetoína). Na presença do resíduo ocorre alteração na coloração do meio, para vermelha, que caracteriza a prova como positiva (Figura 8). A *E.coli* tem como resultados: positivo para VM e negativo para VP.



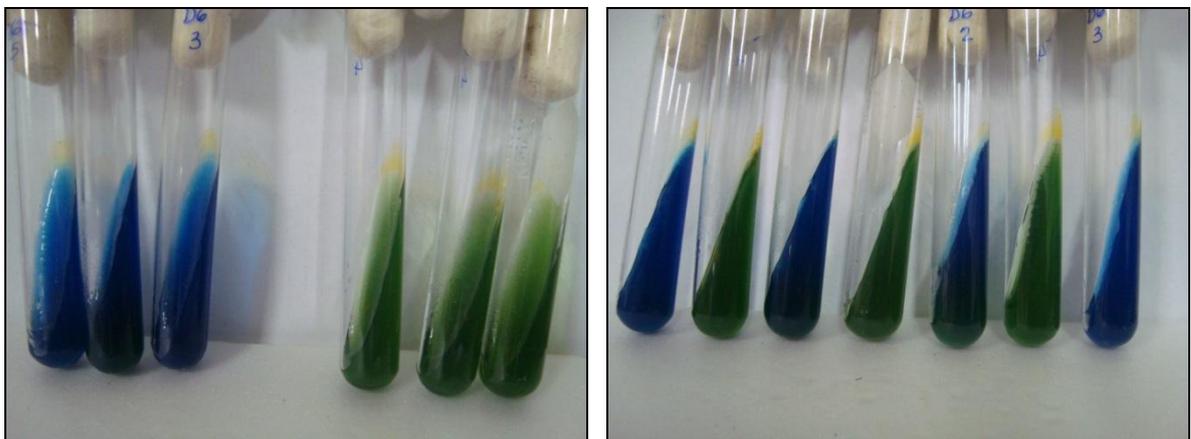
**Figura 8:** Resultado positivo para as provas de VM/VP, confirmado pela coloração avermelhada do meio e do halo de superfície, respectivamente, após a adição das substâncias de reação.

#### 5.3.2.2.3 Prova do Citrato

A capacidade do microrganismo suspeito em utilizar o citrato como fonte de carbono foi avaliada em Ágar Citrato Simmons- ACS (HIMEDIA, M099), estriado com o cultivo do Ágar Nutriente e incubado a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por um período de 48h. Após este período, observava-se a coloração do meio. O meio ACS apresenta coloração verde, que pode ser alterada a azul, se cultivado com microrganismos que utilizam o citrato presente em sua composição como fonte de energia. O meio ACS é composto por citrato de sódio, única fonte de carbono, e azul de bromotimol, indicador de pH. Neste meio não há lactose ou glicose, e na ausência dos carboidratos alguns microrganismos utilizam o citrato como fonte energética.

Durante o preparo dos meios, os tubos que os contêm são inclinados enquanto ainda estão líquidos para que ao solidificar, permaneçam inclinados. Deve-se inclinar os meios uma vez que o  $\text{O}_2$  é necessário para a utilização do citrato. Quando há oxidação do citrato pelo microrganismo, após esse ter sido removido do

meio, ocorre a liberação de  $\text{CO}_2$ , que reage com o Sódio (Na) do Citrato de Sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) produzindo o Carbonato de Sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), produto alcalino. A alcalinidade do meio promove a viragem do indicador de pH de verde para azul. Essa prova é considerada positiva quando ocorre alteração na cor do meio, ou seja, se após 48h de incubação o meio apresentar coloração azul (Figura 9). Alguns microrganismos têm a entrada do citrato facilitada pela enzima citrato-permease, sendo capaz de utilizá-lo como fonte energética. *E.coli* não utiliza o citrato como fonte energética.



**Figura 9:** Resultado da prova do Citrato em meio Ágar Citrato Simmons. A coloração azulada do meio confirma a presença de microrganismos que utilizam o citrato como única fonte de energia.

O cultivo das estirpes suspeitas confirmadas após as provas bioquímicas foram armazenados em Ágar Nutriente para posterior utilização nas provas sorológicas e de sensibilidade aos antimicrobianos.

#### 5.3.2.2.4 Sorologia das estirpes confirmadas de *E. coli*.

Para a realização das provas sorológicas, as culturas positivas para *E. coli* foram inoculadas em Ágar Trypticase de Soja- (ATS), e os cultivos, após 24h de incubação a  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , foram submetidos a testes com os soros polivalentes (PROBAC BRASIL®). O ATS é composto por Caldo Triptona de Soja (MICROMED, 2093) e Ágar Base(HIMEDA, RM026),

Foram utilizados soros polivalentes e monovalentes (PROBAC BRASIL®) para a identificação de *E. coli* Enteropatogênica Classica (EPEC), *E. coli*

Enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC). Todos os soros continham anticorpos contra antígenos O e antígenos superficiais do tipo K, aglutinando em culturas homólogas vivas e aquecidas.

As provas de aglutinação foram realizadas em placa de vidro sanitizada. Aos cultivos em ATS foram adicionados aproximadamente 1,0 ml de solução salina esterilizada, para o preparo de suspensões, das quais foram coletadas as gotas para homogeneização com os antígenos e posterior observação da aglutinação. Cada estirpe foi testada com os soros polivalentes, para posterior análise com os soros monovalentes correspondentes.

Os soros polivalentes utilizados foram: EPEC (POLI A; POLI B; POLI C), EIEC (POLI A; POLI B), e o soro ANTI *E. coli* O157.

Os soros monovalentes disponíveis para utilização eram: EPEC POLI A (O11, O26, O55) EPEC POLI B (O125, O158, O114, O142) EPEC POLI C (O86, O126, O127, O128); EIEC POLI A (O144, O136, O29, O152) EIEC POLI B (O143, O167, O164, O124); EHEC O157.

### 5.3.2.3 Isolamento e contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva

Adotou-se para contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva a metodologia de cultivo em “spread plate”, utilizando o meio de cultura Ágar Baird-Parker- ABP (HIMEDIA, M043), preconizada pela IN N°62(BRASIL, 2003).

Placas contendo o ABP foram inoculadas com 0,1ml de cada diluição preparada a partir da amostra. Trabalhou-se para este microrganismo com diluições até  $10^{-9}$ . A alíquota da diluição homogeneizada era retirada com pipetador automático e ponteiros descartáveis. Com auxílio de alça de Drigalski as alíquotas foram espalhadas sobre a superfície do meio, para a obtenção de um crescimento homogêneo e após 20 segundos, tempo necessário para a sua absorção, as placas foram incubadas, invertidas, em aerobiose, em estufas com temperatura a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48h. Transcorrido o período de incubação, realizou-se a contagem das colônias utilizando aparelho conta colônias. Após a contagem selecionava-se a placa de maior diluição que apresentasse número de colônias entre 20 e 200. As colônias da placa selecionada foram utilizadas em provas confirmatórias e o número obtido na contagem foi utilizado para o cálculo do resultado.

Para a confirmação de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva foram transferidas cinco colônias suspeitas para tubos contendo “Infusion Heart Breain” – BHI (OXOID M0375), com o auxílio de agulha de platina. Os tubos foram incubados por 24h a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Após o período de incubação, retirou-se com alça de platina, uma alíquota, de cada um dos tubos para o preparo de esfregaço. Uma vez corados os esfregaços, pelo método da coloração de Gram, foram observadas as características morfotintoriais dos isolados. *Staphylococcus* spp. apresentam-se na forma de cocos Gram-positivos, agrupados ou não de uma forma semelhante a cachos de uva.

#### 5.3.2.3.1 Prova da coagulase

Como segunda etapa da confirmação foi realizada a prova da coagulase, acrescentando em tubos esterilizados, 0,2ml dos cultivos em BHI e em seguida 0,3mL de plasma liofilizado de coelho (NEWPROV). As alíquotas foram adquiridas com o uso de pipetador automático e ponteiros descartáveis, sendo utilizada uma ponteira para cada amostra. Após homogeneização do cultivo com o plasma, os tubos foram incubados por 24h a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Após o período de incubação realizava-se a leitura dos tubos e classificação dos coágulos de acordo com a IN N°62 (BRASIL, 2003), onde consta a classificação dos coágulos em escala crescente: 1+, 2+, 3+ e 4+, variando segundo a forma. Os coágulos de grau 4+ são os de maior consistência. A coagulase, proteína dos *Staphylococcus* coagulase positiva, no plasma, converte fibrinogênio em fibrina, resultando na formação de coágulo visível.

#### 5.3.2.3.2 Prova da catalase

Em paralelo à prova da coagulase foram realizadas as provas da catalase, também a partir do cultivo em caldo BHI. Alíquotas dos cultivos foram estriadas sobre o Ágar Padrão para Contagem- (APC) (HIMEDIA, M091), previamente inclinados, presente em tubos, que foram incubados a temperatura de  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24h. Após o período de incubação, foram acrescentadas em cada tubo com crescimento de três e cinco gotas de peróxido de hidrogênio 3% e observado as reações. As provas foram consideradas positivas quando observado borbulhamento.

A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio. Os *Staphylococcus* coagulase positiva apresentam esta enzima, sendo a prova positiva para o cultivo desses microrganismos.

A contagem dos *Staphylococcus* coagulase positiva é realizada através da fórmula que consta na IN N°62 (BRASIL, 2003) (Quadro 2, ANEXOS).

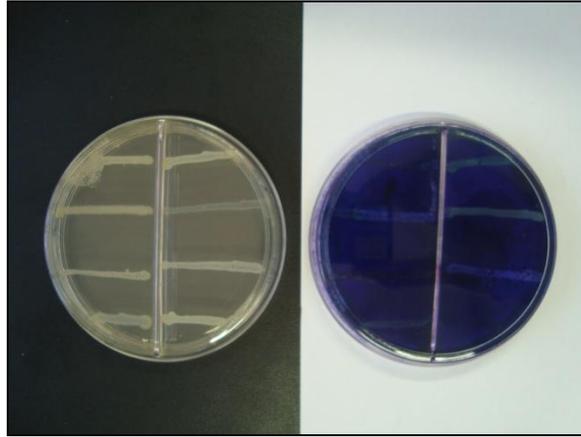
#### 5.3.2.3.3 Identificação de *S. aureus*

Consta na IN N°62 (BRASIL, 2003) que colônias *Staphylococcus* coagulase positivas, quando apresentarem na prova de coagulação formação grau 3+ ou 4+ são consideradas *S. aureus*, agente de alta patogenicidade. Quando o coágulo apresentar grau 1+ ou 2+, embora seja considerado coagulase positiva, devem ser submetidas às provas de Term nuclease e DNase para que sejam classificadas como *S. aureus*.

Todas as estirpes positivas para *Staphylococcus* coagulase positiva cujo coágulo tenha apresentado grau 1+ ou 2+, foram submetidas às determinadas provas para identificação de *S. aureus*.

##### ➤ Prova DNase

A partir do cultivo presente em BHI estriou-se, com linhas horizontais, o meio Ágar DNase (HIMEDIA, M482), o qual foi submetido à incubação por 24h, a temperatura de  $36^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ . Após o período de incubação acrescentava-se sobre a linha de crescimento solução de azul de toluidina 0,1%. O crescimento do microrganismo provoca a despolimerização do DNA do meio, que quando precipitado e em contato com o azul de toluidina, determina o aparecimento de um halo róseo ao redor da linha de cultivo (Figura 10). O *S. aureus* é DNase positiva.



**Figura 10:** Prova de DNase. A presença de halo róseo ao redor da linha de crescimento, após a adição de azul de toluidina, classifica a prova como positiva.

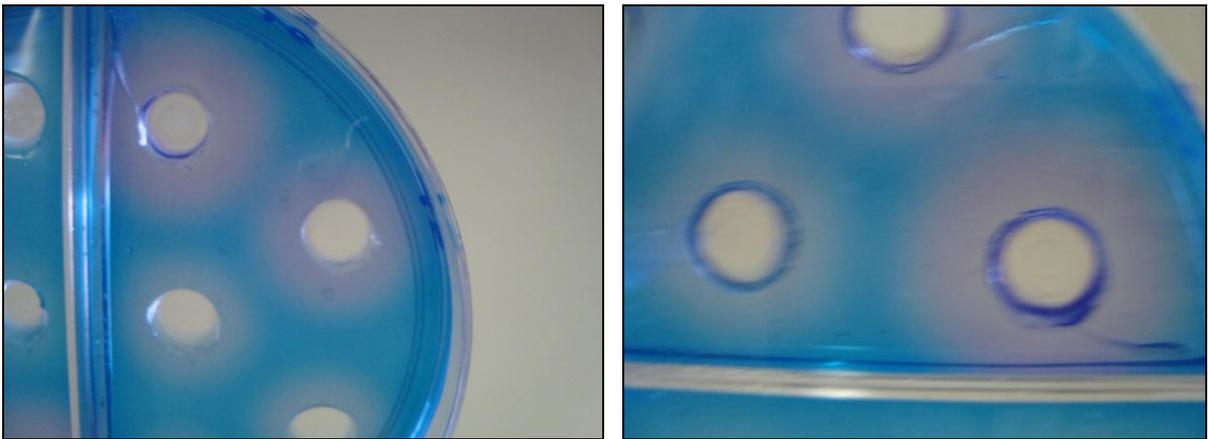
➤ Prova da Termonuclease

Para determinada prova, tubos com os cultivos em BHI, em fase log de crescimento, ou seja, aproximadamente 24h de incubação a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , foram submersos em banho-maria fervente durante 15 minutos, e em seguida resfriados em água a temperatura ambiente. Após o choque térmico, inoculava-se 20 ul de cada cultivo em lacunas arredondadas produzidas em Ágar DNase (HIMEDIA, M482) adicionado de azul de toluidina 1%. As placas eram incubadas em estufa com temperatura a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , no interior de uma câmara úmida, improvisada, para garantir a umidade do meio durante o período de 24h de incubação. Para elaborar um ambiente úmido, foi utilizada uma bandeja forrada com papel umedecido, que após a acomodação das placas, era embalada em plástico filme (Figura 11).



**Figura 11:** Recipiente improvisado, utilizado como câmara úmida nas provas de DNase para classificação das estirpes de *Staphylococcus coagulase* positiva.

A prova baseia-se na capacidade do *S. aureus* de produzir a enzima DNase. Embora outros microrganismos possam fazê-lo, a estabilidade da enzima produzida pelo *S. aureus* é diferenciada, não perdendo a atividade mesmo quando submetida à ebulição por 15 minutos (SIQUEIRA, 1995). A formação de um halo esbranquiçado ao redor do orifício de inoculação indica a ação da enzima sobre o DNA presente no meio, sendo a prova considerada positiva (Figura 12).



**Figura 12:** Reação positiva nas provas de termonuclease para classificação das estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva. Os halos claros ao redor dos poços de cultivo confirmam a presença da enzima.

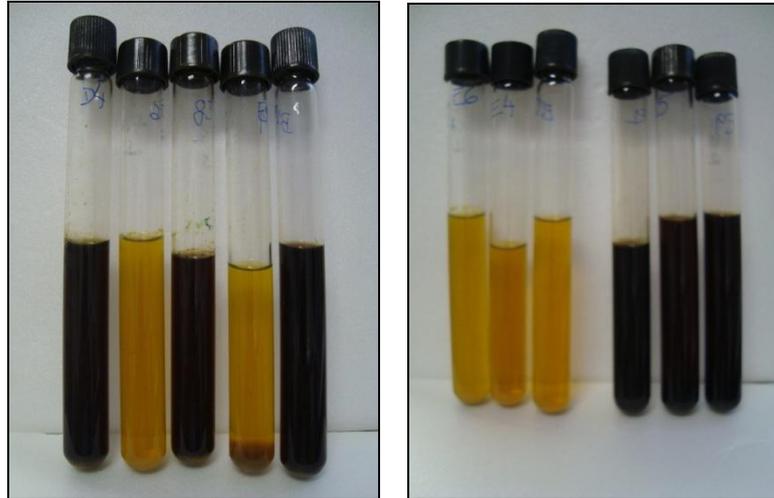
#### 5.3.2.4 Isolamento de *Listeria monocytogenes*.

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi realizada em conformidade com a IN Nº62 (BRASIL, 2003), por meio de enriquecimento seletivo (primário e secundário), plaqueamento e isolamento. Para confirmação da bactéria foram realizadas provas bioquímicas.

O enriquecimento primário consiste na recuperação das bactérias injuriadas e na inibição de microbiota acompanhante, durante a incubação, por 24h a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , de 25 g da amostra analisada homogeneizada a 225 ml do meio de cultura “Modified Listeria Enrichment Broth”- UVM (DIFCO, 222330). A partir desse cultivo fez-se o enriquecimento secundário transferindo 0,1 ml para o 10ml de Caldo Fraser CF (ACUMEDIA, 7502 A) adicionado de 0,1 ml do suplemento SR 156E (OXOID, X4196B), que foi incubado a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 48h.

O Caldo Fraser, utilizado no enriquecimento secundário, contém em sua formulação a esculina, que é hidrolisada pela enzima  $\beta$ -glucosidase produzida pela

*Listeria* spp., reduzindo a glicose e esculina. A reação entre os íons férricos, presentes do caldo, e a esculina promove o escurecimento da cor do caldo. Os caldos enegrecidos após o período de incubação do enriquecimento secundário foram considerados suspeitos para *Listeria* spp. (Figura 13).



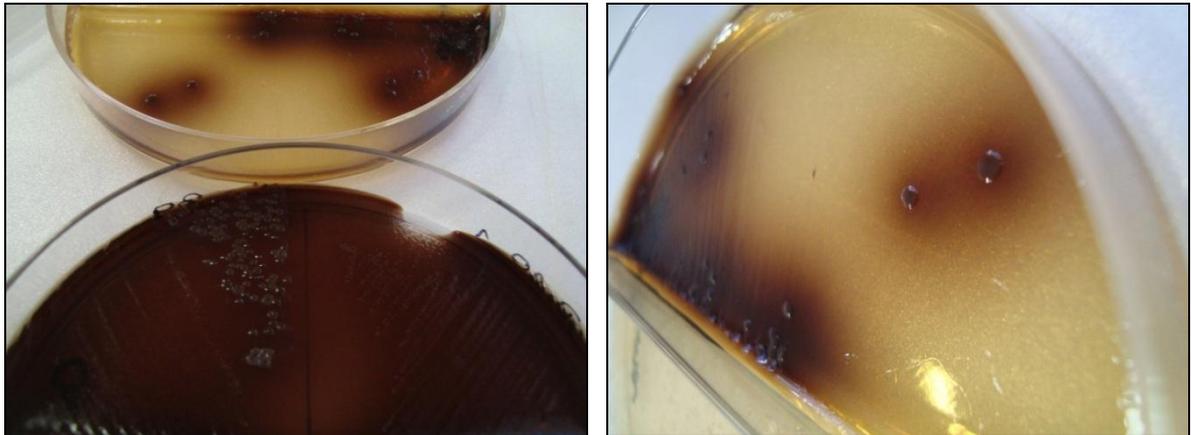
**Figura 13:** Coloração do Caldo Fraser após 24H de incubação. A coloração enegrecida confirma a suspeita para presença de *Listeria* spp., consequente da reação entre a esculina e íons férricos do meio.

O suplemento SR 156 é composto por ácido nalidíxico (10 mg), acriflavina (12,5 mg) e citrato férrico amoniacal (250 mg), substâncias responsáveis pela seletividade do meio, inibindo os microrganismos acompanhantes. As bactérias do gênero *Enterococcus* spp. apresentam a mesma ação sobre a esculina, porém são inibidas pela elevada concentração de sal presente no caldo, possível devido a tolerância da *Listeria* spp. a substância.

Os cultivos suspeitos foram estriados em três diferentes meios seletivos: Ágar Oxford- AO (HIMEDIA, M1145), suplementado com Oxford Listeria Supplement SR0140E (OXOID, 3813B), Ágar Triptose com Ácido Nalidíxico (ATN) suplementado com SR143E (OXOID) e MC Bride Listeria Agar- MMA (BACTO, 0922176) adicionado de 0,2 g/L de cicloeximide (SPECTRUM, C1470). Para o preparo do ATN foi utilizado o Caldo Triptose (HIMEDIA, M177) adicionado de Ágar Base (HIMEDIA, RM201). Os meios estriados incubados a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48h, para posterior avaliação das características morfológicas, distintas em cada meio seletivo. O suplemento SR0140E é composto por cicloeximide (200mg), acriflavina ( 2,5 mg),

colistina sulfato (10 mg) e fosfomicina (5,0 mg), enquanto que na composição do SR 143 encontram-se ácido nalidíxico (10 mg) e acriflavina (12,5 mg).

No meio AO, consideram-se típicas as colônias com coloração preta, rodeadas por halo enegrecido, devido à hidrólise da esculina (Figura 14).



**Figura 14:** Colônias com crescimento característico de *Listeria* spp. em meio Oxford.

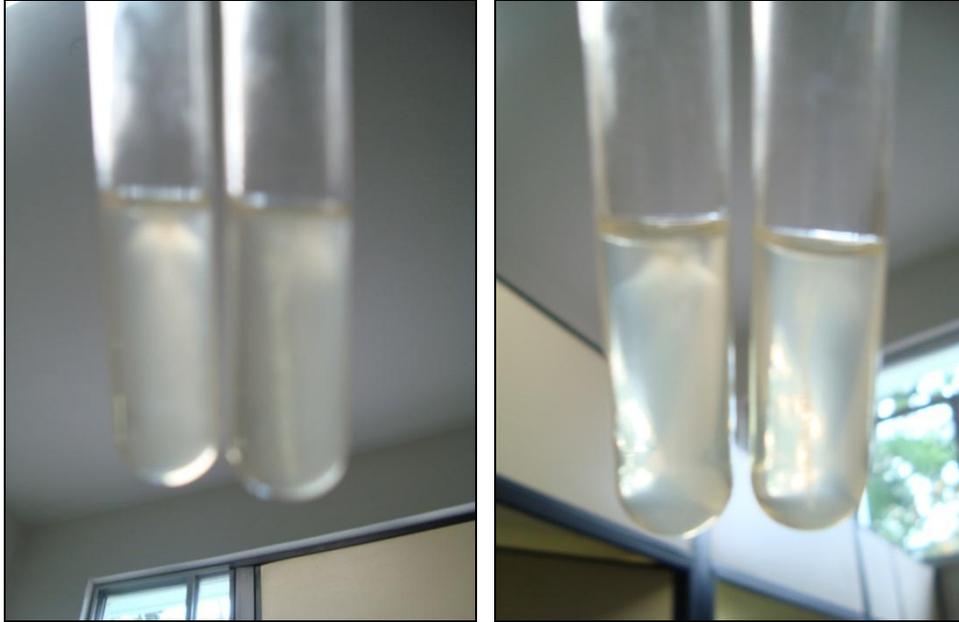
As colônias suspeitas em MMA apresentam coloração azul-acinzentada, enquanto o crescimento característico em ATN é representado por colônias azuladas. Após o período de incubação foram selecionadas colônias suspeitas, em cada meio seletivo, que foram estriadas em Ágar Estoque inclinado, preparado a partir de Caldo Triptose (HIMEDIA, M177) adicionado de 0,6% de Extrato de Levedura (VETEC, 3033). Após a incubação a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24h os cultivos em Ágar Estoque foram utilizados para a realização das provas bioquímicas de confirmação.

A confirmação das colônias foi realizada através de esfregaço seguido de coloração pelo método de Gram, prova da motilidade, catalase, redução de nitrato e VM-VP.

A partir do cultivo suspeito foi preparada uma suspensão, com solução salina esterilizada, para ser utilizada no preparo do esfregaço, que após ser corado pelo método de Gram, foram analisados. A *Listeria* spp. apresenta-se na forma de bastonetes Gram-positivos, pequenos e curtos.

A prova de motilidade foi realizada a partir da inoculação em linha vertical de uma alíquota do cultivo do Ágar Estoque em Ágar Motilidade para *Listeria* spp (Bacto® 0105-175). Após incubado por 48h a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48h, foi observado o

crescimento no meio. *Listeria* spp. apresenta motilidade positiva, com crescimento em formato semelhante a um guarda chuva (Figura 15).



**Figura 15:** Resultado positivo para a prova de motilidade de *Listeria* spp., confirmado pelo crescimento característico em formato de guarda-chuva.

Com o auxílio de uma alça de platina, foi realizada a prova da catalase homogeneizando uma alíquota do cultivo em Ágar estoque com cinco gotas de peróxido de hidrogênio 3%. A *Listeria* spp. apresenta reação positiva nesta prova com conseqüente fermentação do homogeneizado.

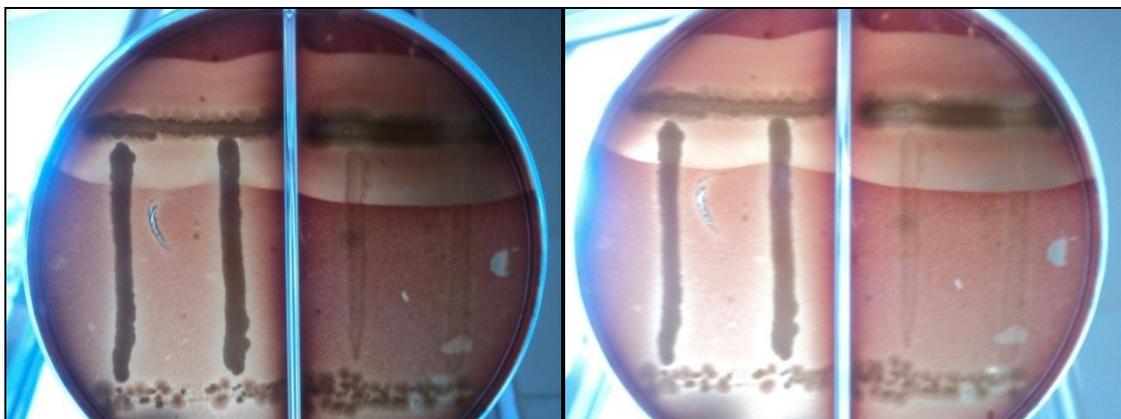
A avaliação da redução do nitrato foi observada a partir da inoculação do cultivo suspeito em Caldo Nitratado, após incubação por 48h a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Para confirmação da reação foram adicionadas ao caldo incubado, duas gotas de alfa-naftilamina 0,5% e duas gotas de ácido sulfanílico 0,8%. Cultivos em que os microrganismos utilizam o nitrato como única fonte de energia ocorre alteração da coloração amarelada para rósea. A *Listeria* spp. não reduz o nitrato.

As provas de VM-VP consistiram na inoculação do caldo MR-VP, presentes em dois tubos, com o cultivo do Ágar Estoque. Após a incubação dos tubos por 96h a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , foram adicionadas três gotas de solução de vermelho de metila 0,06%, para avaliação da prova VM. Enquanto que no segundo tubo, foram adicionados 0,6 ml de alfa-naftol 5% e 0,2 ml de hidróxido de potássio 40%, deixando-o em repouso por 2h. Os resultados das provas foram baseados na

coloração dos caldos após a adição das substâncias. A alteração da cor do caldo de amarelo para vermelho indica a positividade das provas. *Listeria* spp. apresenta reações positivas em ambas as provas.

As amostras que apresentaram resultados característicos nas provas de confirmação foram consideradas positivas para a presença de *Listeria* spp., e submetidas as provas de identificação das espécies: produção de  $\alpha$ -hemólise, CAMP-teste e fermentação de carboidratos, conforme descrito na IN N° 62 (BRASIL, 2003).

A produção de  $\alpha$ -hemólise foi avaliada após a incubação, a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48h, do Ágar Sangue Desfibrinado de Carneiro (ASDC) estriado com o cultivo do Ágar Estoque. Foram considerados positivos os semeados que se apresentaram contornados por uma zona clara. Para diferenciar a *L. monocytogenes* das demais espécies do gênero, que também produzem  $\alpha$ -hemólise, foi realizada a prova de CAMP-teste, que consiste em estriar em Ágar Columbia (HIMEDIA, 144) adicionado de 5% de sangue de carneiro desfibrinado, duas linhas verticais afastadas entre si: uma com semeado de *S. aureus* (ATCC 25923), outra com semeado de *Rhodococcus equi* (ATCC 6939) e entre essas, duas linhas horizontais paralelas entre si, com a bactéria em teste. Após incubação por 72 horas a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  foram observados os crescimentos dos cultivos testados em relação ao *S.aureus* e ao *R. equi*. Diferente de outras espécies do gênero, a *L. monocytogenes* apresenta atividade hemolítica aumentada próximo as linhas dos semeados de *S. aureus* e atividade discreta em relação ao *R. equi* (Figura 16).



**Figura 16:** Prova do CAMP teste, realizada em Ágar Columbia com 5% de Sangue de carneiro. A observação de zona clara de hemólise próxima à linha de crescimento confere a positividade da prova.

As amostras puras de *S. aureus* e *R. equi* utilizadas foram adquiridas no Laboratório de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIO CRUZ), localizado na cidade do Rio de Janeiro. O sangue de carneiro utilizado no preparo do meio de cultura foi coletado, com o auxílio de pesquisadores do Instituto Vital Brazil, de animais criados para fins acadêmicos na fazenda Vital Brazil, localizada em Cachoeira de Macacu, RJ.

As provas de fermentação de carboidratos foram realizadas em tubos contendo Caldo de Fenol Base, com concentrações de 5% de diferentes carboidratos: Xilose, Ramnose, Manitol. Nos caldos foram inoculados os cultivos avaliados, incubando-os a temperatura de 30°C + 1°C por 48h, para na sequência serem avaliadas as colorações dos meios, que eram alteradas quando em reações positivas.

A avaliação dos resultados obtidos nas provas de identificação foi realizada a partir dos dados presentes na IN N° 62 (BRASIL, 2003).

#### 5.3.2.5 Isolamento de *Salmonella* spp.

A uma temperatura de 36°C ± 1°C, foram incubados os homogeneizados de 225 ml de Solução Salina Peptonada 1%(SPP1%) adicionado de 25g das amostras, previamente pesadas em condições assépticas. Esta etapa, denominada de pré-enriquecimento, visa recuperar a viabilidade do microrganismo. Passadas 20 horas de incubação foi realizado o enriquecimento seletivo, que consiste em transferir, com o auxílio de um pipetador automático, uma alíquota de 1ml da amostra pré-enriquecida para um tubo contendo 10ml de Caldo Selenito Cistina- (CSS) (HIMEDIA, M1079), e de maneira semelhante inocular 0,1 ml em um tubo contendo 10 ml de Caldo Rapaport Vassiliadis (RV)(HIMEDIA, 880). Os tubos uma vez inoculados foram mantidos em banho-maria com agitação contínua de água a uma temperatura de 41°C ± 0,5°C durante 20 horas.

Após este período em banho-maria, uma alíquota de cada um dos caldos cultivados foi estriada, com o auxílio de uma alça de platina, em placas descartáveis contendo três divisórias, uma para cada meio seletivo diferente para o isolamento de *Salmonella* spp.: “Salmonella Differential Agar”- (HIMEDIA, 1078), Ágar Verde Brillante, AVB (VETEC, 5054) e Ágar Hecktoen (HIMEDIA, M467). Foram estriados os meios de duas placas para cada amostra, uma placa com o cultivo em CSS e

outra com o cultivo em RV. Depois de estriados os meios foram incubados a temperatura de  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 24h, para observação das características morfotintoriais do crescimento. Foram selecionadas colônias típicas, duas ou três, com o auxílio de uma alça de platina e repicadas em tubos contendo caldo BHI para manutenção, que foram incubados por 24h a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , para realização das provas bioquímicas.

#### 5.3.2.5.1 Provas confirmatórias

O cultivo em caldo BHI foi picado e estriado nos meios Triple Sugar Iron- TSI (HIMEDIA, M021) e Lysina Iron Agar-LIA (HIMEDIA, M377) que em seguida foram incubados por 48h a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Após o período de incubação foram observadas as alterações, nos meios, características de crescimento de *Salmonella* spp.

Quando há o crescimento de *Salmonella* spp., o TSI apresenta-se amarelado na porção inferior do tubo. Essa alteração indicada pelo vermelho de fenol, presente no meio, em decorrência da acidificação consequente do desdobramento da glicose. Na porção média do tubo observa-se uma coloração preta, consequente da produção de  $\text{H}_2\text{S}$ , enquanto que a porção superior, em contato com o oxigênio, apresenta-se avermelhada, devido à utilização da peptona e extrato de carne como fonte de energia, sendo o metabolito alcalino.

O meio LIA apresenta coloração rósea, em casos positivos de *Salmonella* spp., consequente da alcalinização do meio após a descarboxilação da lisina. O indicador purpura de bromocresol, presente no meio, confere essa coloração em meio alcalino.

Ainda como prova confirmatória foram inoculados os cultivos suspeitos, em linha vertical, em tubos contendo meio SIM (FLUKA, 85438), para avaliação de motilidade, e produção de  $\text{H}_2\text{S}$  e Indol. Após incubação dos tubos cultivados por 24 horas a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  foram avaliadas a motilidade dos cultivos. A maioria das salmonelas apresenta motilidade positiva, com crescimento difuso. A produção do  $\text{H}_2\text{S}$  foi avaliada através da coloração enegrecida, quando positiva, na linha de inoculação. A prova do indol foi realizada após a avaliação da motilidade e produção do  $\text{H}_2\text{S}$ , acrescentando ao meio algumas gotas de reativo de Kovac's. A presença de um anel vermelho no meio após a adição do reativo caracterizava a

prova como positiva. *Salmonella* spp. em sua maioria são negativas para esta reação.

Para cultivos com resultados positivos nas provas supracitadas foi realizada a prova da desaminação da fenilalanina, que consisti em estriar o cultivo confirmado nas outras provas em Ágar Fenilalanina (HIMEDIA- M281) inclinado por 24h a 36°C  $\pm$  1°C. Após o período de incubação foi acrescentado sobre o crescimento bacteriano três gotas de cloreto férrico 10%. Em reações positivas ocorre alteração na coloração do meio adquirindo uma cor esverdeada. A *Salmonella* spp. não possui a enzima fenilalanina-desaminase, não sendo capaz de desaminar a fenilalanina no meio. Logo a prova é negativa em crescimentos se *Salmonella* spp.

#### 5.3.2.5.2 Sorologia

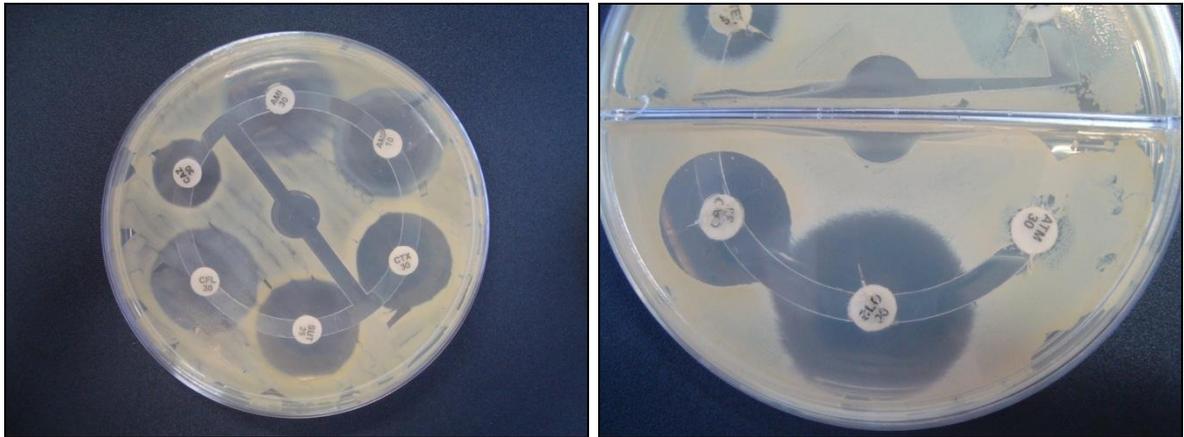
Como prova confirmatória definitiva realizou-se a reação sorológica frente ao antissoro polivalente "O". Essa prova consiste em suspender em 2 ml de solução salina o cultivo em ágar estoque previamente preparado e incubado. Em uma lâmina de vidro foram depositadas separadamente uma gota de solução salina 2% e uma gota do soro anti-salmonella polivalente "O" (PROBAC BRASIL®), e em cada uma delas acrescentada uma gota da suspensão em teste. Após a homogeneização por dois minutos da solução com os antígenos, foram consideradas positivas as colônias cujo homogeneizado apresentava fermentação.

#### 5.3.3 Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana

A avaliação da suscetibilidade das estirpes isolados a antimicrobianos foi baseada na metodologia proposta por Kiery-Bauer (BAUER et al., 1996) com a utilização de discos (Polisensidisc® 4x6 DME) comercializados em caixas com 25 unidades, compostas de 12 agentes específicos cada.

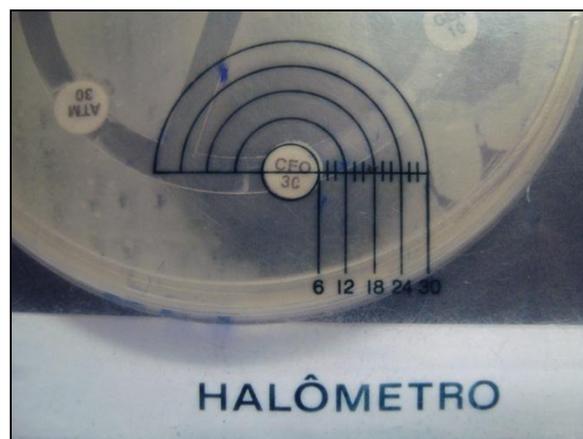
Para essa avaliação, os cultivos a serem testados devem ser recentes, com crescimento na fase log, e devido essa exigência os cultivos a serem testados foram estriados em meios nutrientes esterilizados, que foram incubados a 36°C + 1°C por 24h. Após a incubação foi acrescentada, aos tubos com os cultivos recentes, Solução Salina fisiológica 0,9% suficientes para a obtenção de uma turvação semelhante à escala de 0,5 de Mac Farland, correspondendo a uma concentração

bacteriana final de aproximadamente  $10^8$ . Essa solução foi semeada na superfície do Ágar Muller Hilton- (AMH) (MERK, 10545.7), e em seguida sobreposta pelo disco com os agentes antimicrobianos. Após a adição dos fármacos, as placas foram incubadas por 24h a  $36^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$  (Figura 17).



**Figura 17:** Metodologia para avaliação da susceptibilidade das estirpes aos antimicrobianos testados. As reações são avaliadas em conformidade com o comprimento do halo formado ao redor dos discos, com os fármacos.

O comportamento das estirpes em relação aos antimicrobianos foi avaliado a partir do diâmetro do halo formado ao redor de cada um dos discos, conforme indicado pelo fabricante (Figura 18).



**Figura 18:** Halômetro para aferição dos comprimentos dos halos na avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos.

A partir das recomendações do fabricante, baseada nas características de cada microrganismo, os agentes antimicrobianos testados foram: Clindamicina,

Eritromicina, Oxacilina, Penicilina G, Teicoplanina, Aztreonam, Cefoxitina, Ceftriaxona, Gentamicina, Cloranfenicol, Tetraciclina, Amicacina, Ampicilina, Cefalotina, Cefoxitina, Ceftazidina e Sulfazotrim.

#### 5.3.4 Avaliação estatística

Os resultados foram avaliados através do programa SPP Statistics 17® (Windows). Para a comparação entre os boxes de comercialização quanto às contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes totais e termotolerantes, *E. coli* e aos parâmetros físico-químicos pH, temperatura e umidade, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para as comparações múltiplas (entre os boxes, 2 a 2) foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. A associação entre as variáveis quantitativas foi avaliada através do coeficiente de correlação linear de Person. Em todas as análises foi adotado um nível de significância de 5%.

## 6 RESULTADOS

Os valores encontrados nas análises exigidas em legislação, além dos obtidos em avaliações físico-químicas, para cada amostra analisada, constam nas tabelas de 1 a 10 (APÊNDICES), cuja numeração correspondente à identificação dos pontos de comercialização, presentes na feira livre do estudo. Em relação às análises físico-químicas observou-se grande variação nas aferições de temperatura com valores entre 1,8°C a 24,2°C, e média de 13,4°C. Elevada variação também foi constatada nos percentuais de umidade das amostras, sendo 47,81% e 64,7% os valores mínimo e máximo encontrados. A média para as aferições de pH foi de 5,79, variando entre 4,79 a 6,85.

Quanto às contagens dos microrganismos, *Staphylococcus* coagulase positiva foram encontradas em elevadas concentrações em todas as 58 (96,6%) amostras nas quais foram confirmadas sua presença, variando entre  $2,9 \times 10^4$  a  $4,5 \times 10^{10}$  UFC/g (4,6~10,6 log UFC/g). Somente duas (3,3%) amostras não apresentaram contaminação por este agente etiológico. Dentre as 238 colônias de *Staphylococcus* coagulase positiva confirmadas, 106 (44,5%) foram identificadas como *S. aureus*, conforme parâmetros estabelecidos na IN N°62 (BRASIL, 2003).

O comportamento dos 106 isolados testados aos antimicrobianos foi: 97(92%), 88(83%), 82(77%) e 70(66%) apresentaram resistência, respectivamente, a Aztreonam, Penicilina G, Ampicilina e Clindamicina. 60(57%), 51(48%), 46(56%) apresentaram resistência a Eritromicina, Oxaciclina e Cefoxitina. Os agentes Ceftriaxona, Tetraciclina, Gentamicina Teicoplanina e Clorafenicol inibiram 37(35%), 55(52%), 60(57%), 61(58%) e 96(90%) cepas entre as testadas.

Nas contagens do grupo dos coliformes, foram constatados valores entre  $1,2 \times 10^5$  e  $9,4 \times 10^{10}$  UFC/g (5,07~10,9 log UFC/g) para as concentrações de coliforme totais, presentes em 60 (100%) das amostras analisadas, enquanto que a contaminação por coliformes 45°C foi confirmada em 34 (56,6%) amostras, com contagens entre  $1,2 \times 10^5$  e  $7,5 \times 10^{10}$  UFC/g (4,6~10,8 log UFC/g).

Dentre as 34 amostras contaminadas por coliformes 45°C, a *E. coli* foi isolada em 11(26,4%), com contagens entre  $2,4 \times 10^4$  UFC/g e  $3,7 \times 10^{10}$  UFC/g (4,38~10,56 log UFC/g). Isolaram-se 27 estirpes de *E. coli*, que após as provas de sorologia foram identificadas como 20 (71,4%) EPEC e uma (3,6%) EIEC. Sete (25%) estirpes não aglutinaram quando submetidas à ação dos antígenos analisados. Entre as estirpes

classificadas como EPEC, 10(50%) foram identificadas como sorogrupo O125, quatro (20%) como sorogrupo O158, e outras quatro (20%) e duas (10%) como O55 e O119, respectivamente. A estirpe considerada EIEC foi identificada como sendo do sorogrupo O29.

Quanto ao comportamento das estirpes de *E. coli* em relação aos agentes antimicrobianos constataram-se os seguintes perfis de suscetibilidade: Aztreonam(78%), Ceftazidima (63%), Ampicilina (63%), Gentamicina(45%), Cefotaxima (44%), Cefalotina (22%) e Sulfazotrim (22%), enquanto que os fármacos mais eficientes foram Clorafenicol com inibição de 89% as estirpes, seguido de cefoxitina (67%) e Tetraciclina (63%).

A presença de *Salmonella* spp. foi confirmada em nove (15%) amostras, sendo isoladas 18 estirpes da bactéria. Quando avaliada a susceptibilidade aos antimicrobianos observou-se que Amicacina, Ceftriaxona e Gentamicina inibiram 95% dos isolados. No entanto 95% foram resistentes a Ampicilina e Cefalotina, 77% a Ceftriaxona, 39% ao Clorafenicol e 33% aos agentes Ceftazidima, Sulfazotrim e Aztreonam (Gráfico 4). O comportamento intermediário foi apresentado por 33% e 39% das cepas aos fármacos Tetraciclina e Cefotaxima, sendo esses também considerados de baixa eficiência.

*L. monocytogenes* não foi confirmada em nenhuma das 60 amostras do estudo, porém outras espécies do gênero foram isoladas em cinco (8,3%) amostras, sendo duas identificadas como *L. welshimeri*, e três não identificadas. Quando avaliado o comportamento dos isolados de *Listeria* spp. constatou-se a resistência das cinco (100%) estirpes ao Aztreonam, três (60%) aos agentes Gentamicina, Cefoxitina e Cefotaxima. Os antimicrobianos de maior eficiência foram Clorafenicol, Tetraciclina e Ceftazidima inibindo três (60%), quatro (80%) e quatro (80%) estirpes, respectivamente.

Baseado em limites estabelecidos pela ANVISA, através da RDC N°12 (BRASIL, 2003), para avaliação de queijos minas frescal em próprios ou impróprios ao consumo humano, observou-se que 60 (100%) amostras apresentavam risco à saúde dos consumidores (Tabela 1).

**Tabela 1:** Avaliação das amostras analisadas baseada nos parâmetros estabelecidos na RDC N°12 (BRASIL, 2001).

Microrganismo	Limites estabelecidos (BRASIL, 2001)	Amostras	
		Impróprias ao consumo	Próprias ao consumo
Coliformes termotolerantes	5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	34 (56,6%)	26 (44,4%)
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	58 (96,7%)	2 (3,3%)
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência em 25g	9 (15%)	51 (85%)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausência em 25g	0 (0%)	60 (100%)

## 7 DISCUSSÃO

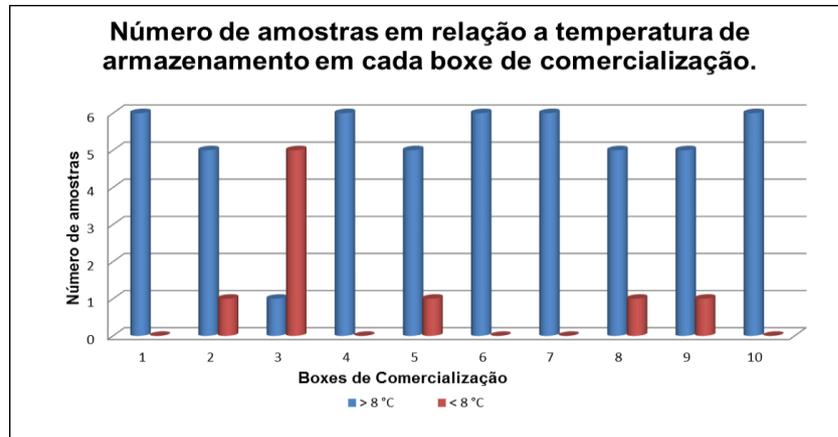
Constam na RDC N°12 (BRASIL, 2001) os parâmetros utilizados, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para o julgamento de queijos, como próprios, ou não, ao consumo humano. Os valores variam em conformidade com os diferentes percentuais de umidade de cada tipo do derivado lácteo. Queijos minas frescal, classificados como de muita alta umidade (BRASIL, 2004), são considerados próprios ao consumo quando em suas análises bacteriológicas constarem contagens para *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes inferiores a  $5,0 \times 10^2$  UFC/g, além de ausência, em 25g, para os microrganismos *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Para avaliação dos parâmetros físico-químicos, pH, umidade e temperatura, foram considerados os padrões estabelecidos por Furtado (2005), Brasil (2004) e Brasil (1997), respectivamente.

### 7.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.

Consta na Portaria N°352 (BRASIL, 1997), que aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo minas frescal o limite de 8°C para a temperatura de conservação do produto durante sua comercialização. Com base nesse parâmetro, apenas nove (15%) amostras estavam em conformidade com o estabelecido. No Gráfico 1 observa-se o número de amostras com temperatura superior a 8°C, no momento da colheita, em cada um dos boxes analisados.

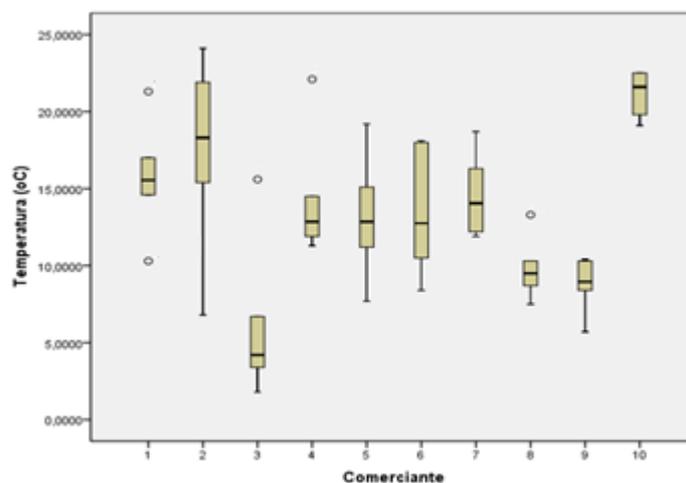
Observa-se que o comerciante de número três apresentou melhores condições de temperatura para a conservação das amostras na maioria dos dias pesquisados, estando apenas a amostra do terceiro dia de colheita com valores superiores a 8°C (TABELA 13, APÊNDICES). No entanto nos boxes de comercialização um, quatro, seis, sete e dez não foram encontradas amostras em condições satisfatórias de conservação.

**Gráfico 1:** Avaliação do número de amostras de queijos minas frescal em conformidade com o limite estabelecido para temperatura de conservação.



Os valores aferidos em amostras do boxe três podem ser confirmados através da observação da representação gráfica, em quartis, para a variável temperatura, nos distintos boxes pesquisados, na qual observam-se também elevadas e variadas aferições nos exemplares de todos os boxes de venda, com exceção do boxe três (Gráfico 2). Contam na Tabela 21 (APÊNDICES) os valores médios aferidos em cada boxe de comercialização.

**Gráfico 2:** Representação, em quartis, da variável temperatura nas amostras dos diferentes boxes de comercialização.



°valores extremos

Quando comparadas aferições de temperaturas das amostras de cada boxe pesquisado nota-se que três (50%) amostras colhidas no boxe dez apresentaram

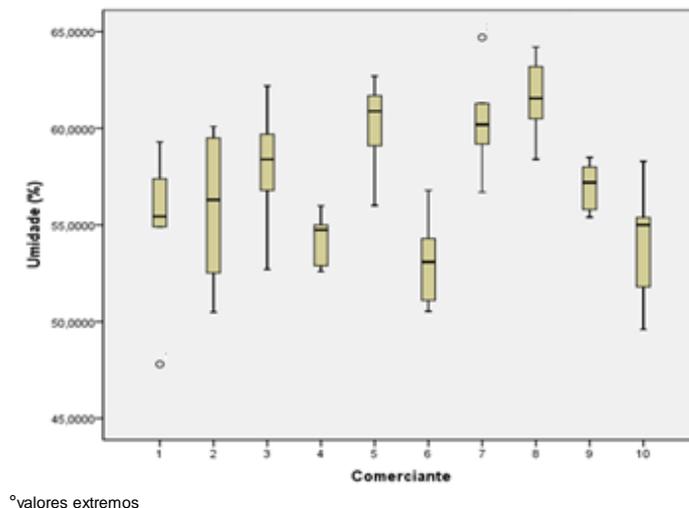
aferições acima de 20 °C, o que também foi avaliado em mais de 25% das amostras do boxe dois (Gráfico 2). A mediana encontrada para as aferições de temperatura foram próximas nos boxes de números quatro, cinco, seis e sete, sendo que ambas encontravam-se acima de 8°C. A variedade nas aferições pode ser atribuída aos valores de temperatura do dia da colheita, uma vez que na maioria dos dias os produtos foram expostos à temperatura ambiente.

Quando comparados os valores de temperaturas aferidos em relação aos boxes de comercialização observou-se variação estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ), porém seria necessário um número superior de amostras para identificar os boxes com essa relação. Em relação às outras variáveis analisadas neste estudo não foi observada correlação estatística ( $p \geq 0,05$ ) com as temperaturas aferidas.

Em relação ao percentual de água, o queijo minas frescal é considerado de muita alta umidade devendo apresentar valores acima de 55% (BRASIL, 2004). Entre as amostras analisadas, 17(28,3%) estavam em desacordo com os padrões estabelecidos.

Consta no Gráfico 3 a representação gráfica, em quartis, para a variável umidade nos diferentes boxes de comercialização, na qual nota-se quase que a totalidade das amostras com valores acima de 50% de umidade. Observam-se também menores variações nas amostras do boxe quatro e nove, porém 75% das amostras do boxe quatro apresentaram valores abaixo de exigido em legislação. Os únicos comerciantes que apresentaram 100% das amostras acima de 55% de umidade foram os de número cinco, sete, oito e nove.

**Gráfico 3:** Representação, em quartis, da variável umidade nas amostras dos diferentes boxes de comercialização.



Não foi observada correlação estatística ( $p \geq 0,05$ ) entre os percentuais de umidade das amostras e as outras variáveis analisadas nesse estudo. Porém quando comparados os percentuais de umidade por boxe de comercialização foi observada variação estatística significativa ( $p=0,04$ ). A identificação dos grupos de comerciantes que apresentaram variação não foi possível devido ao baixo número de amostras. As médias dos valores encontrados para os percentuais de umidade em cada boxe de comercialização podem ser constatadas na Tabela 21 (APÊNDICES).

Em relação aos valores de pH não há padrões exatos estabelecidos. Furtado (2005) considera variações entre 5,1 e 6,6 normais para os derivados estudados enquanto que Germano e Germano (2010) relataram valores entre 6,2 e 6,6. A acidez dos queijos é preconizada durante fabricação pois influencia no processo de coagulação das proteínas do leite, porém Sangaletti et al. (2009) afirmou que valores elevados de acidez podem estar associados a multiplicação de microrganismos..

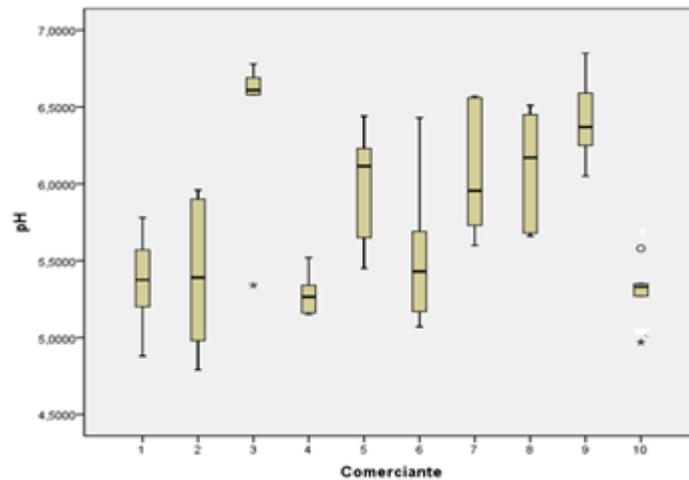
A média dos valores de pH das amostras analisadas foi de 5,79 (Tabela 22, APÊNDICES), acima da média encontrada em estudos na mesma matriz alimentícia, por Machado et al.(2004), porém abaixo dos valores relatados por Sangaletti et al. (2009) no dia 30, último dia de avaliação no estudo da validade comercial do queijo minas frescal. Esses autores relataram variação de 6,6 e 5,85 entre os dias 1 e 30 em queijos mantidos a 4°C, e constataram correlação linear entre o aumento da acidez e a multiplicação da população de microrganismos mesófilos.

Nas amostras estudadas não houve correlação estatística significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre os valores pH e as outras variáveis pesquisadas, porém foi observada variação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os valores de pH quando comparado as

aferições em cada boxe de comercialização. Para identificação dos comerciantes com essa relação seria necessário um número superior de amostras.

No Gráfico 4 consta a representação gráfica, em quartis, para a variável pH nos diferentes boxes de comercialização, e é possível perceber que 50% das amostras dos boxes de número um, dois, quatro, seis e dez apresentaram pH abaixo de 5,5, valor considerado alterado por Germano e Germano, 2010.

**Gráfico 4:** Representação, em quartis, da variável pH nas amostras dos diferentes boxes de comercialização.



°valores extremos

## 7.2 PRESENÇA E CONTAGENS DE MICRORGANISMOS.

Durante a aquisição das amostras observou-se a precariedade na conservação na maioria dos boxes de comercialização. A exposição dos produtos era realizada em bancadas e passíveis de serem manipuladas pelos consumidores e, em alguns boxes, em contato com outros produtos. Alguns comerciantes faziam uso de caixas isotérmicas para a manutenção da temperatura dos queijos, porém era utilizado gelo comum, que durante o período de comercialização fundia, deixando as amostras submersas em água, que além de possível veiculadora de agentes patogênicos, comprometia o percentual de umidade das amostras, devido à qualidade das embalagens.

### 7.2.1 *Staphylococcus coagulase positiva*

Considerando os padrões estabelecidos para *Staphylococcus coagulase positiva* notam-se altos valores para contagens do patógeno, nos diferentes pontos de comercialização nas tabelas de um a 10 (APÊNDICES). Dentre as 58 amostras confirmadas com a presença do microrganismo, 100% apresentaram contagens

superiores ao limite de  $5 \times 10^2$  UFC/g estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2001). Somente duas (3,3%) amostras dentre as 60 avaliadas, não estavam contaminadas.

Contagens expressivas do microrganismo também foram relatadas por Brant et al. (2007) ao considerarem impróprias ao consumo 82,5% das amostras de queijos minas frescal do Serro- MG. Loguercio e Aleixo (2001) julgaram não aptas ao consumo humano, por apresentarem contagens superiores a  $10^3$  UFC/g, 96,67% dos queijos artesanais, avaliados em Cuiabá-MT, confirmando, ainda, serem da espécie *S. aureus* os isolados. Em menor percentual, porém ainda significativo, Peresi et al. (2001), encontraram 60% dos queijos analisados, comercializados em São José do Rio Preto- SP, em não conformidade com a legislação brasileira.

A linha de produção de queijos minas frescal é simples quando comparada a de outros derivados lácteos, porém exige monitoramento constante da qualidade da matéria prima e da higiene dos manipuladores e utensílios utilizados. Mesmo em produções industriais, cujas condições são mais apropriadas à atividade, a inocuidade do produto é comprometida. Salotti et al. (2006), confirmaram essa vulnerabilidade após avaliarem a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, em queijos produzidos industrial e artesanalmente, condenando 10% e 20% das amostras, respectivamente. A julgamento desfavorável de amostras previamente inspecionadas por órgão federal, também foi relatado por Vilela et al. (2001), ao confirmarem a não conformidade com os limites exigidos em 15,7% dos 70 exemplares de queijos minas frescal analisados. Raros são os relatos como os de Grandi e Rossi (2007) que não encontraram o microrganismo em nenhuma das amostras comercializadas em mercados da cidade de Uberlândia- MG.

A susceptibilidade à contaminação de queijos minas frescal produzidos industrialmente, mesmo em menores percentuais, permite o questionamento da inocuidade de fabricações artesanais, cujos recursos são mais limitados e a higienização não é preconizada. A presença de patógenos em queijos industriais, na fase final de fabricação ou durante a comercialização, comprova que um tratamento térmico adequado, embora importante, não é suficiente para garantir a segurança do alimento, Conforme Soto (2009), cuidados na fabricação de derivados lácteos como higienização, manipulação e conservação adequadas influenciam diretamente na inocuidade dos produtos.

*Staphylococcus* spp., além de encontrados normalmente no ambiente, são simbióticos à pele dos humanos, podendo o material de fossas nasais, boca e mãos

de portadores dessa bactéria causar contaminação aos alimentos, segundo Grandó et al. (2008). Nas amostras avaliadas, a precariedade da higienização, além da exposição à manipulação dos consumidores podem ser fontes de contaminação.

Assumpção et al. (2003), constataram a presença de *S. aureus* em queijos prato, após tratamento térmico da matéria fluida, e em amostras coletadas de braços e mãos dos manipuladores. Em trabalho semelhante, após analisarem 92 amostras, coletadas em manipuladores de um laticínio em Góias, André et al.(2006) isolaram 31 cepas do mesmo agente, sendo 16 de suabes da nasofaringe e 15 de suabes das mãos, confirmando a manipulação como possível fonte de contaminação. É importante que se avalie frequentemente o estado de saúde de manipuladores de alimento, garantindo que não sejam fontes de contaminação do produto.

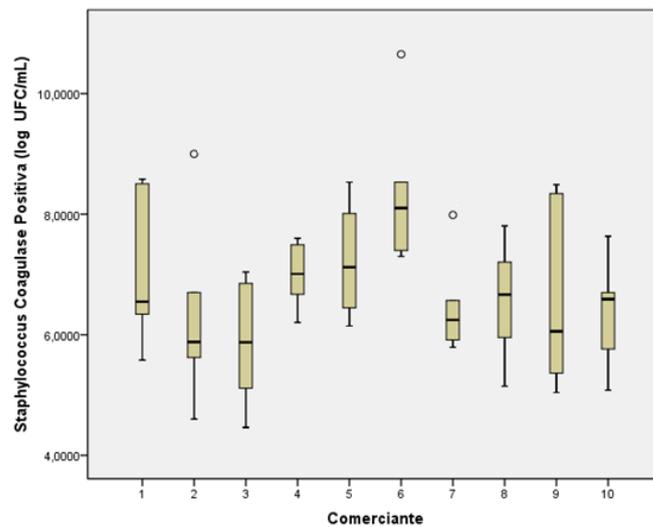
Além da presença do microrganismo, deve-se atentar para sua concentração no alimento, uma vez que, segundo Forsythe (2002), contagens superiores a  $10^5$  células/g de *Staphylococcus* coagulase positiva propiciam a produção de substâncias responsáveis por intoxicações humanas. A concentração mínima de *Staphylococcus* coagulase positiva necessária para a produção de toxina é questionada por alguns autores. Veras (2003) relatou contagens dos agentes inferiores a  $6.10^3$  UFC/g, como responsáveis por sintomas de intoxicação. Com base nesses parâmetros, é alto o risco de intoxicação dos consumidores das amostras estudadas, uma vez que em 56 amostras dentre as 58 confirmadas para presença do agente, foram encontradas concentrações suficientes, segundo Forsythe (2002), para a produção de toxina, e em duas (3,5%), embora com contagens abaixo de  $10^5$  UFC/g, foram encontradas concentrações acima das relatadas por Veras (2003) (Tabelas um a 10, APÊNDICES). A presença da toxina não foi pesquisada neste estudo, contudo foram observadas condições favoráveis a sua produção.

Não foi observada correlação estatística ( $p \geq 0,05$ ) entre as contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva e as outras variáveis analisadas nesse estudo. Quando comparados os valores encontrados para contagens de coliformes totais em cada um dos boxes de comercialização não foi observada variação estatística significativa ( $p \geq 0,05$ ).

No gráfico 5 observam-se as variações de concentrações dos microrganismos encontradas nas amostras dos diferentes comerciantes. Destaca-se o comerciante

de número 6 com 50% das amostras com concentrações de *Staphylococcus* coagulase positiva acima de 8 log UFC/g.

**Gráfico 5:** Representação, em quartis, da variável *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras dos diferentes boxes de comercialização.

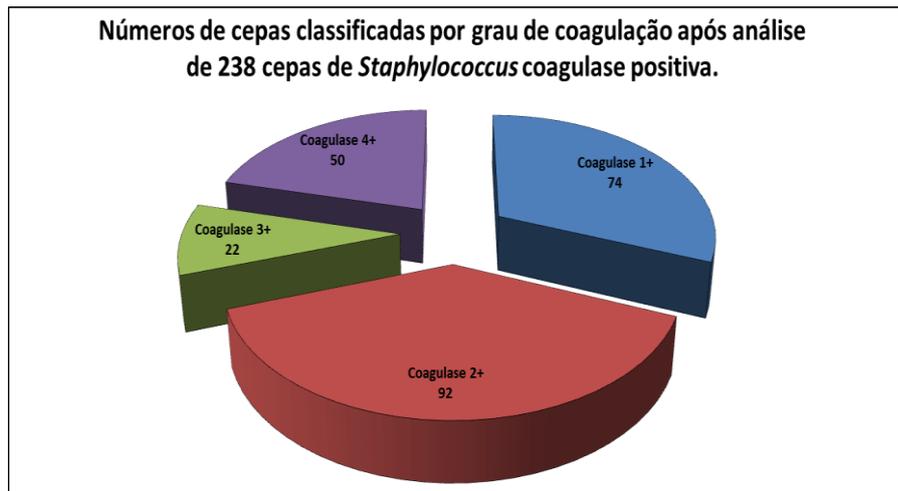


Concentrações elevadas do microrganismo *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos, são suficientes para considerá-los de risco a saúde do consumidor. Porém, em suspeitas de surtos alimentares causados por bactérias do grupo coagulase positiva pesquisam-se espécies específicas, visto que a virulência dos agentes pode ser diferenciada por algumas características. Entre as espécies do gênero *Staphylococcus* capazes de coagular o plasma, *S. aureus* é a mais relatada em casos de surtos de intoxicação, e avaliada como a de maior risco.

Nesse estudo, para a identificação de *S. aureus* entre as 238 cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas isoladas, utilizou-se os padrões contidos na IN N°62 (BRASIL, 2003), que utilizam os resultados das provas de coagulase para essa finalidade. Consta na IN N°62 (BRASIL, 2003) que isolados confirmados de *Staphylococcus* coagulase positiva que apresentam na prova da coagulase, graus de coagulação 3+ e 4+, são considerados *S. aureus*. Para classificar os isolados que apresentam grau de coagulase 1+ e 2+ é necessária a realização das provas de DNase e Termonuclease. Consideram-se *S. aureus* cepas com grau de coagulação 1+ e 2+ com resultados positivos a ambas as provas.

Após a realização da prova da coagulase nas 238 cepas isoladas, 22 (9,2%), e 50 (21%), foram classificadas como grau de coagulase 3+ e 4+, respectivamente. Enquanto que 74 (31%) foram classificadas como 1+ e 92 (38,6%), como 2+ (Gráfico 6).

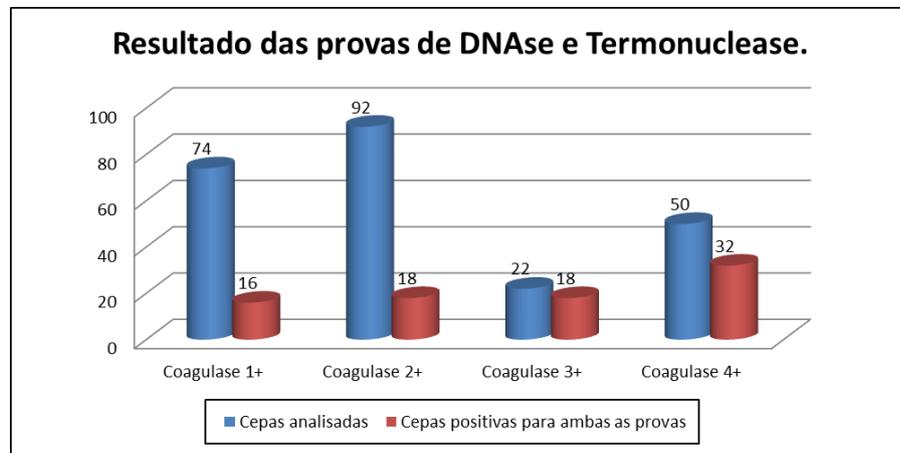
**Gráfico 6:** Classificação das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos minas frescal em relação ao grau de coagulação.



Após serem submetidas às provas de DNase e Termonuclease, 34 cepas, dentre as 166 com grau de coagulase 1+ e 2+, apresentaram resultados positivos a ambas, e foram classificadas como *S. aureus*. Somadas as 72 cepas de grau de coagulase 3+ e 4+, foram isoladas 106 (45,38%) cepas de *S. aureus* dentre as 238 de *Staphylococcus* coagulase positiva, previamente isoladas.

A metodologia para a identificação de *S. aureus* proposta pela IN N°62 (BRASIL, 2003), pode ser questionada, uma vez que em 22 (30,5%) cepas com grau de coagulase 3+ e 4+, quando submetidas às provas de DNase e Termonuclease, não foram encontrados resultados positivos, o que sugere a presença de outra espécie com elevada capacidade de coagulação (Gráfico 7).

**Gráfico 7:** Resultado das provas de DNase e Termonuclease das cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas isoladas.



Devido a esse questionamento, nesse trabalho, as cepas cujo grau de coagulase foram 3+ e 4+ e as cepas com grau de coagulase 2+ e 1+, positivas a ambas as provas de DNase e Termocuclease, foram consideradas de alto risco patogênico e submetidas a ação dos antimicrobianos.

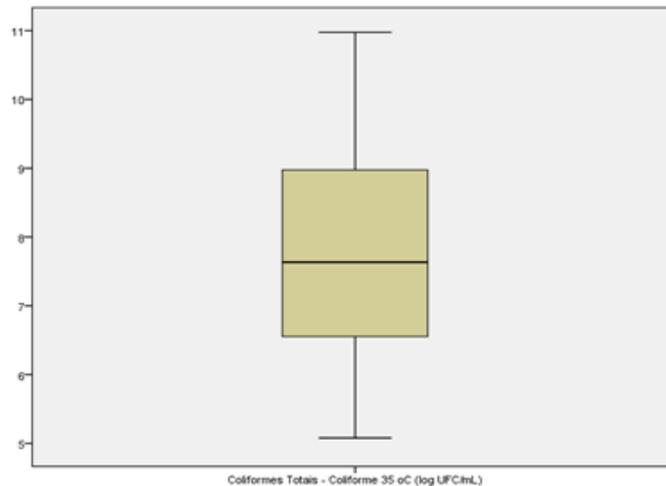
### 7.2.2 Coliformes totais, termotolerantes e *E. coli*.

Embora não influencie no julgamento de queijos minas frescal em apto ou não ao consumo humano, a pesquisa de coliformes totais permite uma avaliação das condições de higiene das amostras. A presença em elevadas concentrações dos microrganismos comprometem as características sensoriais do queijo, pois competem com a microbiota natural do leite, prejudicando o processo de coagulação e conservação.

Os valores encontrados para contagens de coliformes totais em cada amostra analisada constam nas tabelas de um a 10 (APÊNDICES), onde observam-se elevadas concentrações em 100% dos exemplares avaliados, com valores superiores a  $1,2 \times 10^5$  UFC/g (5,079 log UFC/g), sendo a média  $3,2 \times 10^9$  UFC/g (7,7 log UFC/g) (tabela 22, APÊNDICES). O Gráfico 8 representa as concentrações, mínima e máxima, em log UFC/g, além da mediana 7,63 log UFC/g encontrada nas contagens de coliformes totais nas amostras analisadas. Observa-se no gráfico que

em 25 % dos exemplares analisados foram encontradas contagens acima de 9 log UFC/g.

**Gráfico 8:** Diagramas de extremos e quartis (Box-plot) da variável coliformes totais.



O número de amostras encontradas com coliformes totais nesse trabalho superaram aos encontrados por Brant et al. (2007), que confirmaram a presença de bactérias do grupo em 33 (80%) amostras de queijos minas artesanais do Serro, MG. Zaffari et al. (2007) relataram o mesmo percentual de contaminação, ao confirmarem a presença de coliformes totais em 80 (100%) amostras de queijos artesanais comercializados no estado do rio grande do Sul.

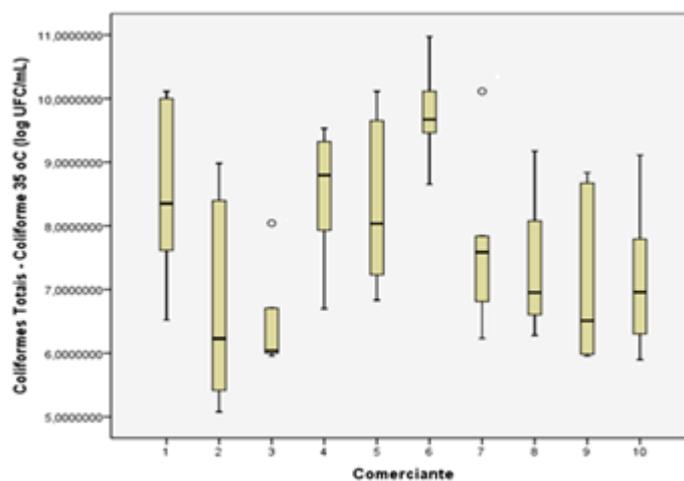
Segundo Brant et al. (2007), a presença de coliformes totais pode ser associada a práticas inadequadas de higienização durante o processamento, conservação e transporte dos derivados lácteos. A exposição das amostras durante a comercialização ao contato com utensílios possivelmente contaminados, também pode influenciar nessa contaminação. O tratamento térmico, se empregado adequadamente ao leite durante o processamento de queijos elimina a limites aceitáveis as concentrações do grupo coliformes. Porém, produtos produzidos com leite cru, isentos de tratamento térmico, apresentam elevada contaminação devido às condições da matriz alimentícia para a multiplicação das bactérias.

Não foi observada correlação estatística ( $p \geq 0,05$ ) entre as contagens de coliformes totais e as outras variáveis analisadas nesse estudo. Quando comparados os valores encontrados para contagens de coliformes totais em cada um dos boxes de comercialização foi observada variação estatística significativa

( $p=0,04$ ), porém seria necessário um número superior de amostras para identificação dos boxes que apresentaram essa variação.

No Gráfico 9 constam as representações em quartis da variável coliformes totais para cada boxe de comercialização. Destacam-se o boxe de número seis, em cujas amostras foram encontradas maiores contagens, com valor mínimo de 8,65 log UFC/g e mediana 9,67 log UFC/g, e o boxe três cujas concentrações encontradas nas foram as com menor variação.

**Gráfico 9:** Representação em quartis da variável coliformes totais nos diferentes boxes de comercialização.

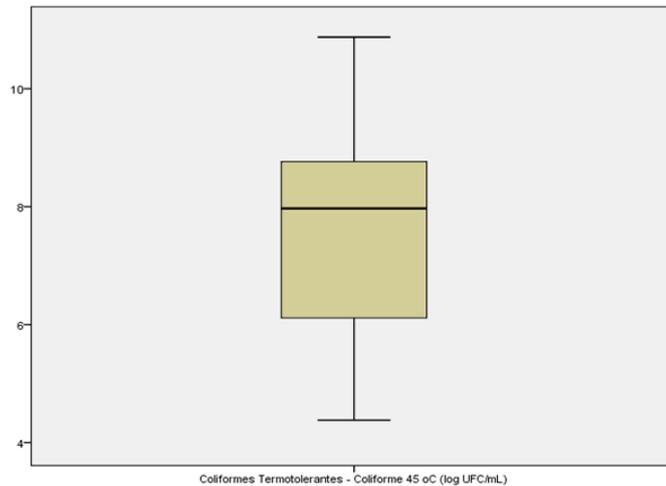


° presença de valores considerados extremos.

Em relação à contagem de coliformes termotolerantes, a presença dos microrganismos foi confirmada em 34(56,6%) amostras dentre as analisadas, sendo que 100% dessas foram consideradas não aptas ao consumo humano por apresentarem contagens superiores a estabelecidas como limite pela ANVISA (BRASIL, 2001).

Quando avaliada a representação em quartis da variável coliformes termotolerantes, no Gráfico 10 notam-se as elevadas e variadas concentrações das bactérias do grupo nas amostras do estudo, porém todas com contagens acima de 4,3 log UFC/g, que corresponde a  $2,4 \times 10^4$  UFC/g, superior ao limite de  $5 \times 10^2$  UFC/g (2,69 log UFC/g) estabelecido por meio da RDC N°12, pela ANVISA (BRASIL, 2001).

**Gráfico 10:** Diagramas de extremos e quartis (Box-plot) da variável coliformes termotolerantes.



Ao pesquisarem a presença de coliformes termotolerantes em 80 amostras de queijos artesanais, no Rio Grande do Sul, Zaffari et al.(2007), relataram menor percentual de condenação, estando 52 (84%) amostras em desacordo com o padrão da ANVISA, assim como Loguercio e Aleixo et al. (2001), que consideraram impróprias ao consumo humano 28 (93,3%) amostras de queijos artesanais comercializados em Cuiabá-MT.

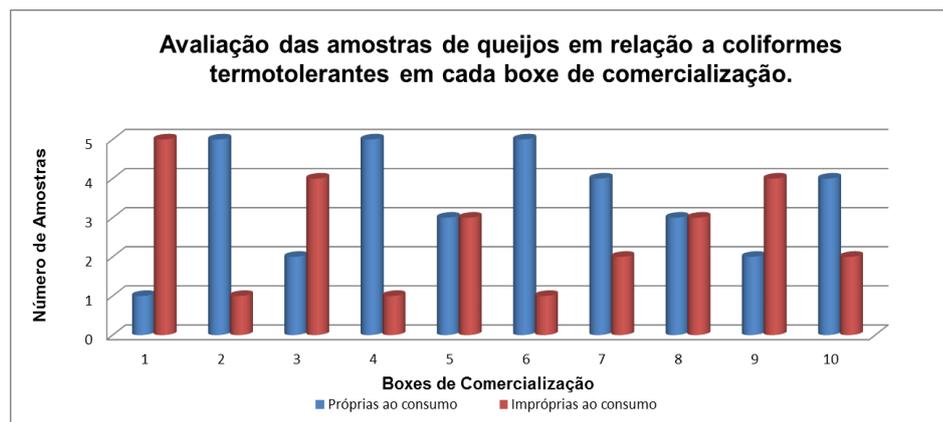
Salloti et al. (2006), após analisarem, em Jaboticabal-SP, queijos minas frescal industriais e artesanais, constataram a presença de coliformes 45°C em 100% das amostras, sendo 83,3% das artesanais e 66,7% das industriais condenadas como impróprios ao consumo. Embora em menor percentual, decorrente da eliminação de concentrações iniciais na pasteurização, a contaminação dos produtos industrializados confirma a susceptibilidade da matéria fluida durante outras etapas do processamento. Silva et al. (2010) após avaliarem 120 amostras de leite pasteurizado, no Rio de Janeiro- RJ, relataram que 57,5% estavam fora dos padrões estabelecidos em relação ao grupo dos termotolerantes.

Grandi e Rossi (2007), ao relatarem a presença de coliformes termotolerantes acima dos limites aceitáveis em 60% das amostras de queijos industriais, comercializadas em Uberlândia-MG, confirmaram que mesmo produtos fiscalizados são suscetíveis à contaminação. Além da qualidade higiênica sanitária, a avaliação de microrganismos do grupo coliformes pode auxiliar na avaliação da eficiência dos

tratamentos térmicos, aos quais os alimentos são submetidos. Sousa (2006) esclareceu que a presença de bactérias Gram-negativas sugere tratamentos térmicos inadequados ou de uma provável contaminação posterior. As fabricações artesanais por pequenos produtores, sem estrutura adequada e acompanhamento profissional capacitado, ficam mais expostas à contaminação por estes microrganismos.

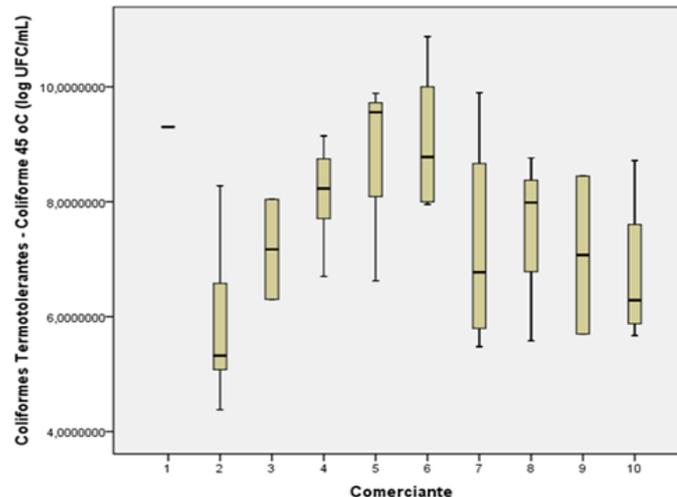
A presença de coliformes termotolerantes foi confirmada em amostras de todos os boxes de comercialização pesquisados neste estudo, destacando a condenação de cinco das seis amostras dos comerciantes de números dois, quatro e seis. Entre as amostras analisadas no boxe de número um, apenas uma apresentou contagens para os microrganismos (Gráfico 11).

**Gráfico 11:** Avaliação das amostras contaminadas em relação à presença de coliformes termotolerantes em cada boxe de comercialização.



As variações de concentrações dos microrganismos encontradas nesse trabalho podem ser consequência de diferentes metodologias de fabricação, e cuidados na conservação, transporte e na comercialização dos distintos comerciantes. No Gráfico 12 é possível verificar a representação, em quartis, da variável coliformes 45 °C em cada um dos boxes de comercialização.

**Gráfico 12:** Representação em quartis da variável coliformes termotolerantes nos diferentes boxes de comercialização.



Para avaliação do Gráfico 12, deve-se considerar o número de amostras contaminadas em cada boxe, presente no Gráfico 11. Quando comparados os boxes com mais de uma amostra contaminadas, percebe-se percentual maior de amostras com valores menores para as contagens de coliformes termotolerantes no boxe dois em relação aos boxes de número quatro e seis, ambos com cinco amostras impróprias ao consumo humano. Porém, mesmo baixas, 100% das amostras no boxe dois apresentaram contagens acima de 4 log UFC/g. O estudo de um número maior de amostras, em cada boxe de comercialização, aliado ao de procedimentos na fabricação dos derivados lácteos, talvez permitisse associar a taxas de contaminação aos cuidados higiênicos, métodos de conservação e transporte das amostras de cada comerciante.

Não foi observada correlação estatística ( $p \geq 0,05$ ) entre as contagens de coliformes termotolerantes e as outras variáveis analisadas nesse estudo. Também não foi observada variação estatística significativa ( $p \geq 0,05$ ) quando comparados os valores encontrados em cada um dos boxes de comercialização.

Dentre os microrganismos que compõem o grupo dos coliformes termotolerantes, a *E. coli* é o melhor indicador de contaminação fecal, que em alimentos pode ser ocasionada pela manipulação de operários, utilização de matéria prima de má qualidade, quando não submetida a tratamento térmico, além de precária higienização de equipamentos e outros fômites. Em Franca- SP, Amaral et

al. (2004), relataram a contaminação, por coliformes termotolerantes, de águas utilizadas em propriedades leiteiras, confirmando também serem de *E. coli* os isolados. A *E. coli*, foi confirmada em 11(18,3%) amostras analisadas nesse estudo.

Na tabela 2 constam as amostras condenadas assim como as contagens encontradas em cada exemplar.

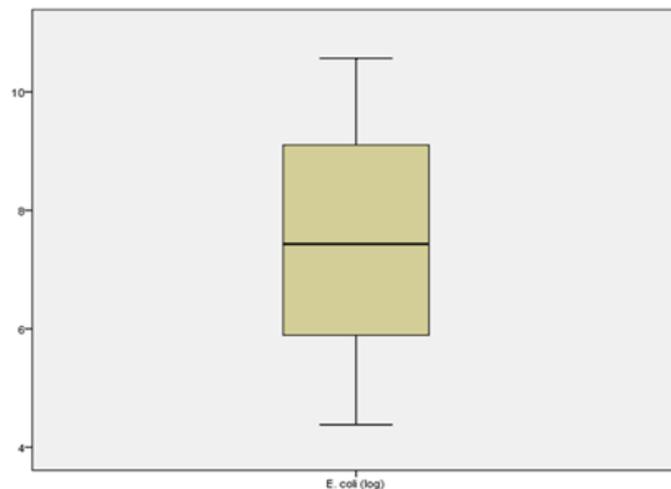
**Tabela 2:** Amostras cuja presença de *E.coli* foi confirmada. Valores das contagens do microrganismo, características sensoriais das amostras positivas e respectivas estirpes isoladas.

AMOSTRAS POSITIVAS	CONTAGEM (UFC/g)	CONTAGEM (log UFC/g)	TEMPERATURA (°C)	UMIDADE (%)	pH	COLÔNIAS ISOLADAS	PATOTIPO	SOROGRUPO
A5	2.7 x10 <sup>7</sup>	9,43	18,1	56,8	5,21	A5(3)	EPEC	O125
						A5(4)		NC
						A5(5)		NC
B6	6X10 <sup>8</sup>	8.77	18	51,1	5,17	B6(5)	EPEC	O125
C2	2.1X10 <sup>5</sup>	5,32	24,1	52,52	4,79	C2(2)	EPEC	O125
						C2(3)	EPEC	O125
						C2(4)	EPEC	O125
						C2(5)	EPEC	O125
C6	3.7X10 <sup>10</sup>	10,56	13,5	50,54	5,07	C6(3)	EPEC	O125
						C6(4)	EPEC	O125
D2	2.4X10 <sup>7</sup>	7,38	20,8	57,51	4,98	D2(4)	EPEC	O55
D5	7.7X10 <sup>9</sup>	9,88	19,2	56,01	5,45	D5(2)		NC
						D5(4)	EPEC	O55
						D5(5)	EPEC	O158
D7	2.7X10 <sup>5</sup>	5,43	16,3	56,7	5,6	D7(3)	EPEC	O55
						D7(4)	EPEC	O55
						D7(5)	EPEC	O119
D8	4.8X10 <sup>7</sup>	7,68	8,7	58,4	5,66	D8(2)	EPEC	O119
						D8(4)	EIEC	29AC
D10	3.1X10 <sup>6</sup>	6,49	22,5	58,29	5,58	D10(1)		NC
						D10(2)	EPEC	O158
						D10(4)	EPEC	O158
						D10(5)	EPEC	O158
F7	1.3X10 <sup>6</sup>	6,11	12,2	61,29	5,73	F7(2)	EPEC	O125
F10	4.7X10 <sup>5</sup>	5,67	22,5	54,9	5,27	F10(1)		NC
						F10(5)		NC
						F10(4)		NC

NC: Colônias cujas reações com o antígeno não apresentaram aglutinação.

É possível observar as elevadas concentrações da bactéria nas amostras, que podem ser confirmadas na representação em quartis presente no Gráfico 13. Os valores encontrados nas contagens de *E. coli* variaram entre 5,32 e 10,56 log UFC/g, com mediana igual a 7,43 log UFC/g.

**Gráfico 13** Diagramas de extremos e quartis (Box-plot) da variável *E. coli*, representado em log UFC/g.



A presença da bactéria também foi detectada em amostras de derivados lácteos pesquisadas por Loguercio e Aleixo (2001), em Cuiabá – MT, e Feitosa et al.(2003), no Rio Grande do Norte RN. Almeida Filho e Nader Filho (2002) relataram a presença de *E. coli* em 24 (30%) amostras de queijo minas frescal artesanal dentre as 80 pesquisadas em Poços de Caldas – MG, e afirmaram que este tipo de produto compromete a saúde dos consumidores. O valor médio de  $9,3 \times 10^3$  UFC/g encontrado por Almeida Filho e Nader Filho (2002) é inferior a média de  $8,0 \times 10^8$  UFC/g encontrada neste trabalho.

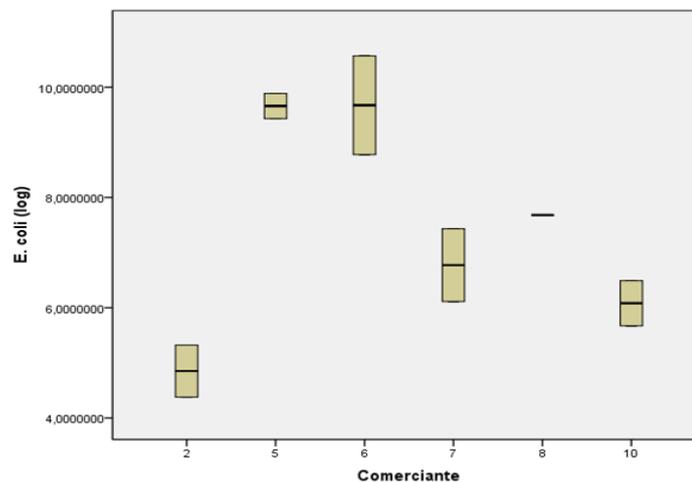
Ao avaliarem a presença de *E. coli* na linha de processamento de queijos minas frescal, Rocha et al. (2006) constataram o aumento de 2 log UFC/g, quando os derivados eram originados de leite fluido pasteurizada e de 4 log UFC/g quando na produção era utilizado leite cru, confirmando a influência da pasteurização na concentração final do microrganismos no produto. O leite cru pode apresentar-se contaminado pela bactéria assim como por outros agentes patogênicos em decorrência da ordenha de animais não sadios, como relatado por Langoni et al. (2006), após confirmaram a presença da *E. coli* em 1,8% das amostras de leite caprino avaliados.

Não foi observada correlação estatística ( $p \geq 0,05$ ) entre as contagens de *E. coli* e as outras variáveis analisadas. Assim como também não foi observada

variação estatística significativa ( $p \geq 0,05$ ) quando comparados os valores encontrados para contagens do agente em cada um dos boxes de comercialização.

Embora não tenha sido significativa estatisticamente, a variação das concentrações nas amostras, em cada box de comercialização, pode ser avaliada no Gráfico 14, que consta a representação em quartis da variável *E. coli* nas amostras separadas por boxes de origem. Nota-se amostras com menor contagens no box de número dois, enquanto que nos boxes cinco e seis, 100% das amostras apresentaram contagens acima de 8 log UFC/g para o agente.

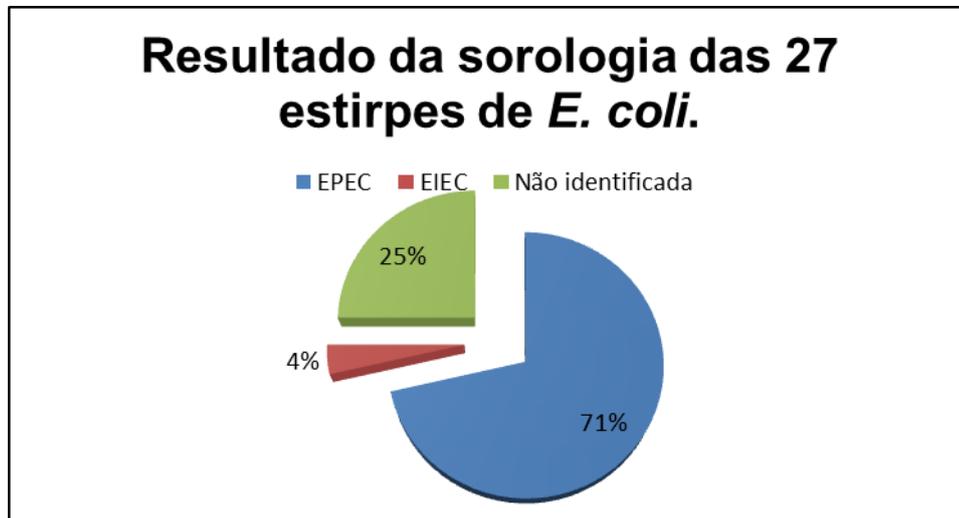
**Gráfico 14** Representação em quartis da variável *E. coli* nos diferentes boxes de comercialização.



Na legislação não há citação da obrigatoriedade da pesquisa e contagem de *E. coli* para avaliação da qualidade dos exemplares avaliados, uma vez que são estabelecidos limites para a contagem de coliformes termotolerantes. Porém, segundo Trabulsi (2008) a identificação da bactéria é importante cientificamente porque embora faça parte da microbiota normal do intestino humano, pode apresentar linhagens com risco patogênico comprovado à saúde coletiva.

As estirpes de *E. coli* foram submetidas as provas sorológicas e classificadas conforme consta no Gráfico 15.

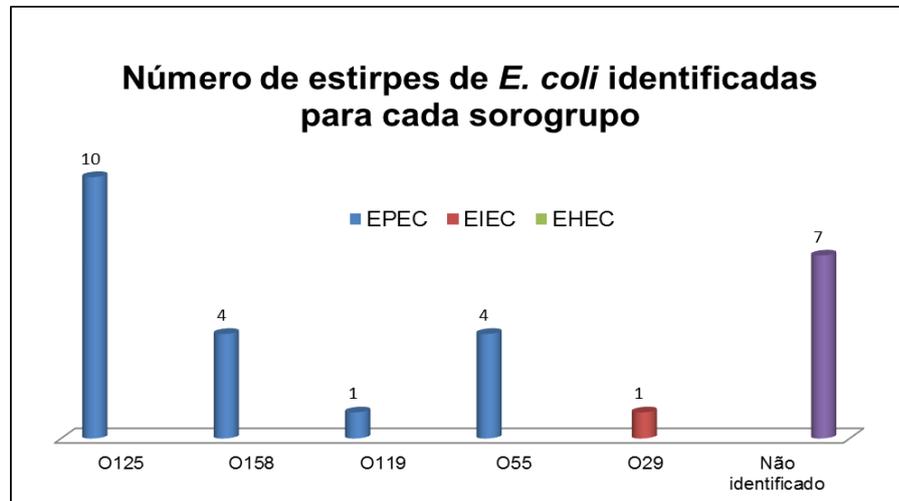
**Gráfico 15:** Percentuais das cepas de *E. coli* encontrados para cada patotipo após as provas sorológicas.



Ao avaliar as estirpes isoladas de *E. coli* foram identificadas 19 (71%) como patotipo *E. coli* Enteropatogênica. Em menor percentual, Silva et al. (2001) também confirmaram serem do grupo EPEC, 46 (22,1%), dentre as 208 cepas de *E. coli* isoladas em 90 amostras de leite pasteurizados, comercializados no Rio de Janeiro, identificando 15,2% sorogrupo O55 (15,2%). Pereira et al. (1998) pesquisaram *E. coli* em 168 amostras de queijo, relatando a presença de EPEC em 21 (11,09%). Araujo et al. (2002) identificou como EPEC 32 cepas, dentre as 161, isoladas em 44 queijos comercializados na cidade do Rio de Janeiro.

No Gráfico 16 constam a identificação das estirpes em cada sorogrupo dos patotipos encontrados. Quando identificados os sorogrupos de 32 cepas de *E. coli* isoladas por Araujo et al. (2002), a partir de queijos comercializados no Rio de Janeiro, foram encontrados três (9,3%) cepas do sorogrupo O125 e seis (18,7%) O55. O número de cepas identificadas nesse trabalho como sorogrupo O55 foi menor que a relatada por Araujo et al. (2002), porém maior em relação aos sorogrupos O125 e também O119, que não foram identificados pelos outros autores.

**Gráfico 16:** Identificação dos sorogrupos das estirpes de *E. coli* isoladas.



Paneto et al.(2007) ao identificarem os sorogrupos de cepas de EPEC, isoladas em queijos minas frescal artesanais, produzidos na região centro oeste do Brasil, relataram 6%, 2% e 2% das estirpes como O125, O55 e O119, respectivamente, valores percentuais menores que os encontrados neste trabalho.

A presença de EPEC nas amostras pesquisadas pode oferecer risco quando consumida por indivíduos sensíveis a esse grupo de bactérias, normalmente crianças, segundo Jay (2005). Embora limitado o grupo considerado de risco, a possibilidade de infecção existe, devido à falta de conhecimento dos consumidores, além da possibilidade de contaminações cruzadas no ambiente residencial, por meio de utensílios comuns ao fracionamento de alimentos e do contato entre o alimento contaminado e alimento inócuo. As residências no Brasil são apontadas, conforme dados apresentados pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), como os principais ambientes relacionados a surtos alimentares entre os anos de 2000 e 2011.

A presença de um isolado de EIEC de sorotipo O29 é preocupante uma vez que, segundo Trabulsi (2008), bactérias desse grupo provocam infecções intestinais semelhantes à shigelose, com inflamação e necrose da mucosa do cólon, e ao contrario da EPEC é nociva a todas as faixas etárias.

### 7.2.3 *Salmonella* spp.

Na Agência Nacional de Vigilância Sanitária é preconizada a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g do produto para considerá-lo apto ao consumo humano. Com base nesse parâmetro, nove (15%) dos queijos analisados foram considerados impróprios ao consumo, devido à confirmação da presença do microrganismo. Resultados expressivos em matriz alimentícia semelhante originada do tipo de processamento, foram descritos por Grandi e Rossi (2007), em Uberlândia- MG, e por Peresi et al. (2001), em São José do Rio Preto, que condenaram uma (5%) e duas (6,7%) amostras, respectivamente.

Os resultados obtidos opõem-se aos relatados por diversos autores, como Brant et. al (2007), Salotti et. al (2006), Pinto (2011), que não isolaram o microrganismo em nenhuma das amostras de queijos minas analisadas em suas pesquisas nos municípios de Serro- MG, Jaboticabal- SP e Santa Helena- PR, respectivamente.

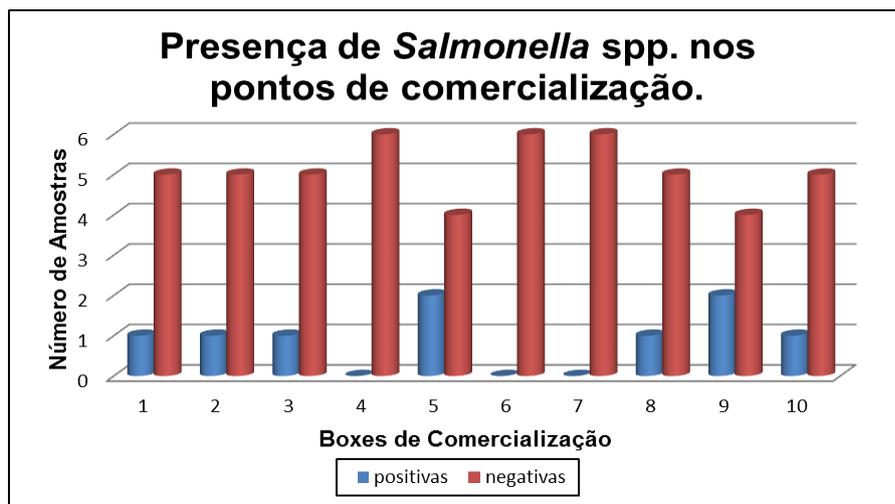
Conforme relatado por Temelli et al. (2006), existem diversas possíveis fontes de contaminação para as amostras condenadas. Segundo Pereira et al. (1999), a detecção de *Salmonella* spp. em queijos é consequência da utilização de matéria prima contaminada não pasteurizada, oriunda de animais não sadios ou da manipulação do leite, por portadores da bactéria, durante seu beneficiamento. A água, utilizada na higienização de equipamentos e utensílios, quando não potável, também pode comprometer a inocuidade do produto.

Consta no Gráfico 17 o número de amostras positivas para a presença de *Salmonella* spp. em cada um dos boxes de comercialização, sendo possível observar que ao menos uma amostra de cada ponto de venda, excetuando os de número quatro, seis e oito, foram condenadas para o microrganismo.

A elevada microbiota encontrada nas contagens de outros microrganismos evidenciam a precariedade na higiene dos produtos. As condições de comercialização, em recipientes e embalagens inapropriados, além da exposição à contaminação cruzada, devido à proximidade a outros tipos de alimentos, possíveis veiculadores da bactéria, são possíveis responsáveis pela contaminação das amostras analisadas. A ausência de pasteurização da matéria fluida, também deve

ser levada em consideração, como origem da contaminação das amostras, uma vez que, segundo Feitosa et al. (2003), esse tratamento térmico não é realizado na maioria das fabricações de queijo minas frescal produzidos artesanalmente, contudo não obteve-se informações com relação a esse aspecto nas amostras analisadas..

**Gráfico 17:** Número de amostras confirmadas para presença de *Salmonella* spp. em cada ponto de comercialização.



Embora seja possível o crescimento de *Salmonella* spp. em pH entre 4,4 e 9,0, os valores ótimos para a adaptação das bactérias estão entre 6,5 e 7,5 (Jay, 2005). Se considerados esses valores, em 48 (80%) amostras dentre as analisadas foram encontradas aferições abaixo da considerada ótima ao crescimento do agente. Conforme observado na tabela 3, das nove amostras impróprias ao consumo neste estudo, seis possuíam valores de pH a partir de 5,9, próximo a faixa ideal. A acidez dos queijos pode ser creditada as bactérias lácticas, porém agentes contaminantes acidificantes, quando em elevadas concentrações aceleram essa acidificação garantindo aferições ainda menores que as consideradas normais ao produto (MACHADO et al., 2004).

**TABELA 3:** Parâmetros físico-químicos das amostras positivas para presença de *Salmonella* spp. e condições de isolamento das estirpes.

AMOSTRAS POSITIVAS	TEMPERATURA (°C)	UMIDADE (%)	pH	ESTIRPES	RASTREABILIDADE DOS MEIOS DE ISOLAMENTO		
					ENRIQUECIEMNTO E SELEÇÃO	MEIO SELETIVO	PROVA BIOQUIMICA
A1	21,3	47,80	4,88	A1(1)	RAPPAPORT	AVB	TSI
A3	6,7	57,79	6,62	A3(1)	SELENITO	DIFERENCIAL	LIA/TSI
A5	18,1	56,8	5,21	A5(1)	RAPPAPORT	AVB	LIA
				A5(1)	SELENITO	AVB	LIA
				A5(1)	SELENITO	DIFERENCIAL	TSI
				A5(1)	RAPPAPORT	DIFERENCIAL	LIA
				A5(2)	SELENITO	AVB	LIA
A8	10,3	64,21	6,51	A8(1)	SELENITO	DIFERENCIAL	TSI
				A8(1)	RAPPAPORT	AVB	LIA
				A8(2)	RAPPAPORT	DIFERENCIAL	LIA
				A8(2)	SELENITO	DIFERENCIAL	TSI
				A8(2)	RAPPAPORT	AVB	LIA
				A8(3)	RAPPAPORT	DIFERENCIAL	LIA
B2	15,4	55,1	5,9	B2(1)	SELENITO	DIFERENCIAL	LIA
B5	13,1	61,69	6,44	B5(2)	RAPPAPORT	DIFERENCIAL	LIA
B9	10,4	55,8	6,3	B9(1)	SELENITO	DIFERENCIAL	TSI
E9	8,4	57,29	6,59	E9(1)	SELENITO	DIFERENCIAL	LIA
E10	19,1	55,1	5,31	E10(3)	SELENITO	DIFERENCIAL	LIA/TSI

Diferencial: Agar *Salmonella* diferencial  
 Rappaport: Caldo Rappaport Vassiliadis  
 Slenito: Caldo Selenito Cistina

#### 7.2.4 *Listeria monocytogenes*

Em nenhuma das 60 amostras analisadas foi confirmada a presença de *Listeria monocytogenes*, resultado semelhante aos relatados por Peresi (2001) ao avaliar queijos minas frescal comercializados em feiras livre da cidade de São José do Rio Preto- SP, e por Salotti et al. (2006) e Brant et al. (2007), que também não isolaram a bactéria ao avaliarem a mesma matriz alimentícia nas cidades de Jabotical- SP e Serro-MG, respectivamente.

Os resultados deste trabalho não corroboram com os apresentados por Silva et al. (1998), que isolaram a bactéria em 7(41,2%) das 17 amostras avaliadas. Também não se assemelham aos relatos de Carvalho et al. (2005) que ao analisarem 93 queijos minas frescal, submetidos a diferentes métodos de processamento e comercializados na cidade de Campinas-SP, relataram a presença de *Listeria* spp. em 11(11,8%) amostras, sendo que em três (3,2%) o isolado foi identificado como *L. monocytogenes*.

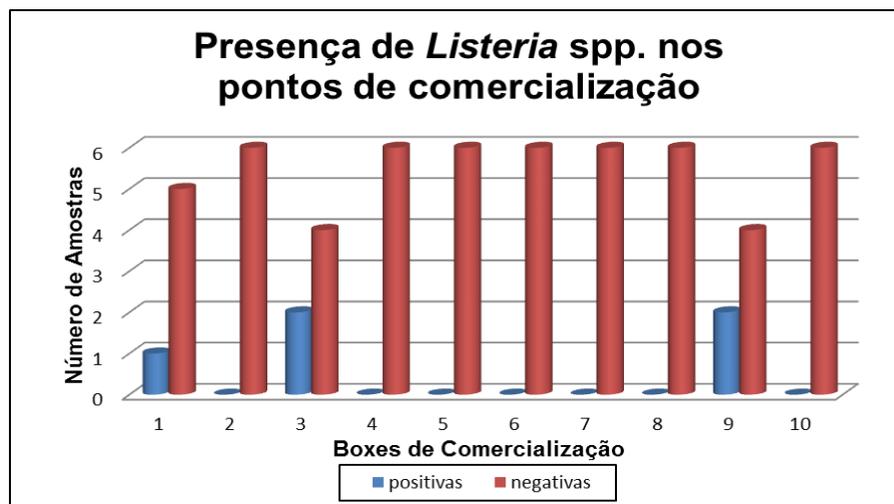
Outros derivados lácteos produzidos artesanalmente foram considerados impróprios ao consumo, por Zaffari (2007), devido à confirmação da presença de *Listeria* spp. em 16% das amostras analisadas, comercializadas no Rio Grande do Sul- RS, sendo dessas 3,7% identificadas como *Listeria monocytogenes*. Em pesquisa realizada em queijos coalhos artesanais, no estado do Ceará, Borges et al. (2003) observaram a prevalência de *Listeria* spp. em 6,9% das amostras confirmado 2,3% dos isolados como *L. monocytogenes*. Duarte et al. (2005) ao analisarem queijos coalhos de fabricação artesanal no estado do Pernambuco, isolaram *Listeria* spp. em 12 (9,5%) amostras e dentre essas sete foram confirmadas com *L. monocytogenes*.

Mesmo não detectada, a presença de *Listeria monocytogenes* pode ser questionada uma vez que, segundo Gasanov et al. (2005) a presença de qualquer espécie de *Listeria* spp. pode ser um indicativo da presença de *Listeria monocytogenes* por essa ser menos competitiva que as outras espécies do gênero, especialmente na presença de substâncias seletivas ou de altas contagens de outros microrganismos. Conforme consta na tabela 5, neste trabalho foram isoladas cinco cepas de *Listeria* spp. em 5 (8,3%) diferentes amostras sendo duas identificadas como *L. welshimeri* e três não identificada por não apresentarem resultados compatíveis com os estabelecidos na IN N°62 (BRASIL, 2003), para a identificação. A *L. welshimeri* não é considerada um risco aos consumidores por não estarem associadas a surtos alimentares em humanos, porém sua detecção é importante devido a possível associação a outras espécies do gênero com potencial patogênico. Os resultados obtidos nas provas de identificação das cepas isoladas podem ser constatados na tabela 4 e comparados aos padrões estabelecidos em legislação (BRASIL, 2003) (QUADRO 1, ANEXOS).

**Tabela 4:** Resultados obtidos nas provas para identificação da *Listeria* spp.

Amostra	Provas de Identificação							Identificação
	$\alpha$ -hemólise	CAMPtest-St	CAMPtest-Re	Fermentação carboidrato			Red-NO <sub>3</sub>	
				Manitol	Ramnose	Xilose		
A3(1)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	<i>L. welshimeri</i>
F3(1)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	indefinido
B9 (1)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	indefinido
C9(1)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	indefinido
D1(1)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	<i>L. welshimeri</i>

Em três boxes de comercialização foram encontrados produtos confirmados para a presença de *Listeria* spp., como pode ser observado no Gráfico 18.

**Gráfico 18:** Representação do número de amostras contaminadas por *Listeria* spp. em cada um dos boxes de comercialização.

A *Listeria* spp. no presente estudo poderia ter sido isolada em um número maior de amostras se considerada condições de processamento e contaminação das amostras analisadas uma vez que, segundo Gasanov et al. (2005), as espécies do gênero podem tornar-se injuriadas quando expostas a adversidades térmicas, osmóticas, químicas e a competição pela microbiota acompanhante e conforme Jantzen et al. (2006) células injuriadas apresentam maior sensibilidade aos componentes seletivos do meio, podendo haver dano a sua membrana, interferindo em sua permeabilidade e prejudicando sua multiplicação. Vlaemynck e Moermans

(1996) relataram ainda que níveis de *Listeria* spp. abaixo de  $10^2$  UFC/g dificilmente são detectados pela metodologia tradicional.

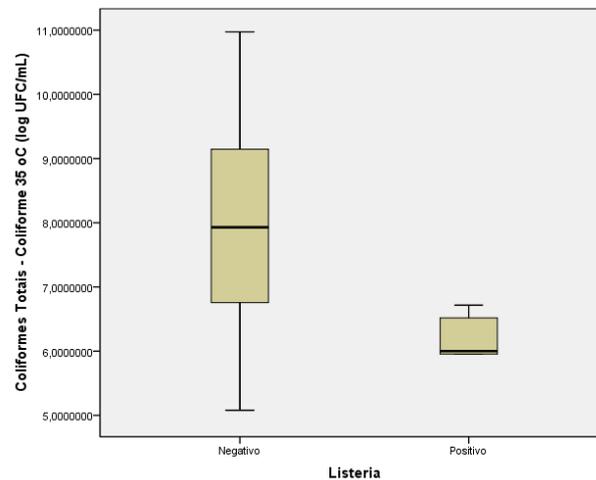
As amostras analisadas possuíam valores de temperatura que podem ter sido limitante a presença e ao isolamento do patógeno, que segundo Gasanov, (2005) se adaptam melhor em alimentos submetidos à refrigeração. As aferições de temperaturas encontradas nas amostras com presença confirmada de *Listeria* spp. variaram entre 4,3°C e 10,4°C, compatíveis com a ideal para a bactéria, porém a maioria das amostras apresentaram temperaturas acima da média que foi de 13,4°C. Outro possível fator limitante ao isolamento do agente, nas amostras analisadas, é sua baixa competitividade, característica do gênero e principalmente de *Listeria monocytogenes*, uma vez que elevadas concentrações de outros microrganismos contaminantes como coliformes totais e *Staphylococcus* coagulase positiva foram encontradas nas amostras analisadas (Tabela 5).

**Tabela 5:** Resultados encontrados nas aferições dos parâmetros físico-químicos e nas contagens dos microrganismos contaminantes nas amostras com presença confirmada de *Listeria* spp.

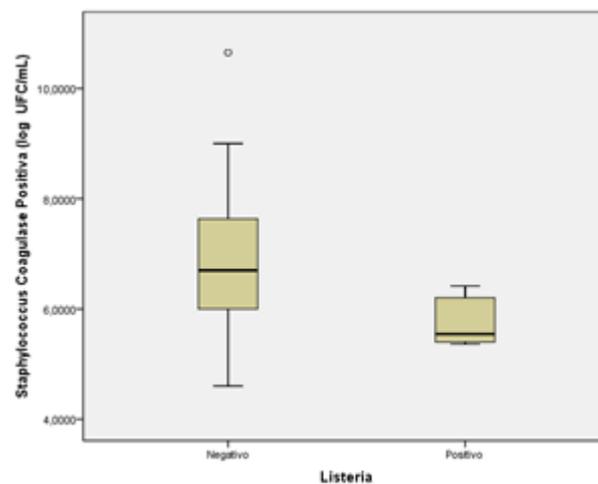
AMOSTRAS POSITIVAS	CONTAGEM COLIFORMES 35°C (UFC/g)	CONTAGEM <i>Staphylococcus</i> COAGULASE POSITIVA (UFC/g)	TEMPERATURA (°C)	UMIDADE (%)	pH
A3	$1.0 \times 10^6$	$3.5 \times 10^5$	6,7	57,79	6,62
B9	$9.0 \times 10^5$	$2.3 \times 10^5$	10,4	55,8	6,3
C9	$5.2 \times 10^6$	$2.5 \times 10^5$	5,7	57,1	6,44
D1	$3.3 \times 10^6$	$2.6 \times 10^6$	10,3	57,39	5,41
F3	$9.0 \times 10^5$	$1.6 \times 10^6$	4,3	59,01	6,6

Nos Gráficos 19 e 20 observa-se que embora presente, a contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes totais foram encontradas em menores concentrações nas amostras em que foram confirmadas a presença de *Listeria* spp.

**Gráfico 19:** Representação em quartis das concentrações de coliformes totais nas amostras analisadas em relação à presença e ausência de *Listeria* spp.



**Gráfico 20:** Representação em quartis das concentrações de *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras analisadas em relação à presença e ausência de *Listeria* spp.



## 7.3 SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

### 7.3.1 *Staphylococcus* considerados de alto risco patogênico

Constam nas tabelas 13, 14 e 15 (APÊNDICES), os comportamentos das estirpes a cada antimicrobiano testado. O percentual de resistência e sensibilidade

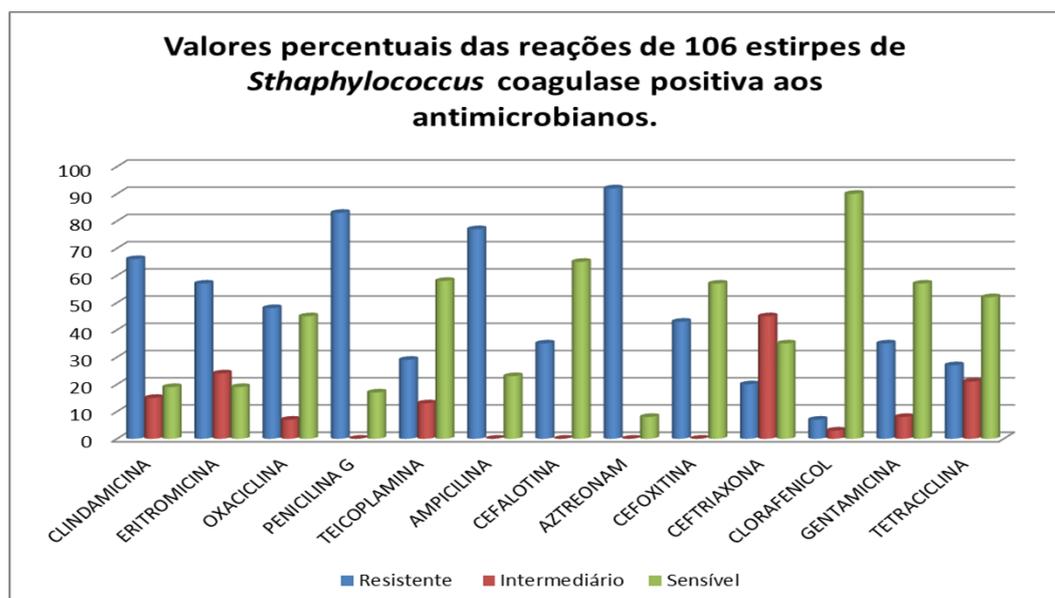
encontrado para cada antimicrobiano pode ser observado na tabela 6 e confirmados no Gráfico 21.

**Tabela 6:** Valores percentuais do comportamento de 106 cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* aos antimicrobianos testados.

ANTIMICROBIANO	COMPORTAMENTO DAS ESTIRPES DE <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>		
	SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE
CLINDAMICINA	20 (19%)	16 (15%)	70 (66%)
ERITROMICINA	20 (19%)	26 (24%)	60 (57%)
OXACICLINA	48 (45%)	7 (7%)	51 (48%)
PENICILINA G	18 (17%)	0 (0%)	88 (83%)
TEICOPLAMINA	61 (58%)	14 (13%)	31 (29%)
AMPICILINA	24 (23%)	0 (0%)	82 (77%)
CEFALOTINA	69 (65%)	0 (0%)	37(35%)
AZTREONAM	9 (8%)	0 (0%)	97 (92%)
CEFOXITINA	60 (57%)	0 (0%)	46 (43%)
CEFTRIAXONA	37(35%)	48 (45%)	21 (20%)
CLORAFENICOL	96 (90%)	3 (3%)	7 (7%)
GENTAMICINA	60 (57%)	9 (8%)	37(35%)
TETRACICLINA	55 (52%)	22 (21%)	29 (27%)

Conforme observado no Gráfico 21 os antimicrobianos menos eficientes ao combate das estirpes estudadas foram Aztreonam, Penicilina, Ampicilina, Eritromicina e Clindamicina.

**Gráfico 21:** Relação percentual das reações das estirpes isoladas de *Staphylococcus* de alto risco patogênico à ação dos antimicrobianos.



A resistência a Penicilina de 88 (83%) cepas, entre as analisadas, assemelha-se a apresentada por 80% dos *Staphylococcus aureus*, isolados em água de propriedades leiteiras de Franca SP, relatada por Amaral et al. (2004). O autor associou o comportamento dos isolados à utilização maciça do antimicrobiano ao tratamento de mastite nas propriedades. A ineficiência do fármaco também foi observada, em estudo, por Langoni et al.(2006), que descreveram a resistência de 87,5% das cepas de *S. aureus*, isolados de leite caprino mastítico. Após avaliarem a suscetibilidade aos antimicrobianos de 19 cepas de *Staphylococcus aureus*, 11 da cavidade nasal e oito das mãos de manipuladores de uma indústria de laticínios em Santa Catarina, Grandó et al. (2008) observaram a resistência de 82% e 75%, respectivamente, dos isolados a Penicilina.

A resistência de 82 (77%) cepas analisadas, nesse estudo, a Ampicilina, superou a encontrada por Langoni et al.(2006), que relataram 75% dos *S. aureus*, isolados de leite caprino mastítico, resistentes ao fármaco. A resistência a Penicilina e Ampicilina, bem como a outros agentes  $\beta$ -Lactâmicos (Aztreonam, Oxaciclina, Ceftriaxona, Cefoxitima e Cefalotina), pode está associada, segundo Li et al.(2007), à produção de  $\beta$ -lactamase, decorrente do uso indiscriminado ou em sub dosagens dos antimicrobianos do grupo.

Conforme observado na tabela 6, 51 (48%) cepas testadas foram resistentes a Oxaciclina, e se considerados o comportamento intermediário apresentado por 7 (7%) cepas, tem-se que a maioria dos agentes isolados apresentaram certa resistência a ação do fármaco. Percentual maior que o relatado por Freitas et al.(2005), que confirmaram a resistência ao fármaco de 21(35%) das 59 cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* isoladas de amostras de leite de animais mastíticos, em Pernambuco. Rampini et al.(2004) encontraram 18 (81,8%) cepas de *S aureus*, dentre as 22 isoladas de queijos coalho artesanais resistentes a Oxaciclina.

Os *Staphylococcus Oxaciclina* resistentes são importantes causas de infecção nosocomial em humanos, se disseminam facilmente em ambientes hospitalares e apresentam multirresistência aos antimicrobianos comumente utilizados. Em estudos recentes têm sido confirmado que a resistência à Oxaciclina dos *Staphylococcus* não se restringe a áreas internas de hospitais, podendo ser isolados também em indivíduos saudáveis, como comprovado por Menegotto e Picoli (2007), que isolaram *S. aureus* resistentes em amostras da cavidade nasal de indivíduos sadios. O

elevado percentual de resistência ao fármaco apresentado pelas cepas testadas admite o isolamento dos agentes em ambientes extra-hospitalares, além da possível veiculação por manipuladores infectados, durante a fabricação dos derivados.

Em relação à Eritromicina, a resistência de 57% das estirpes estudadas supera o percentual de 45% de cepas resistentes, apresentados por Menegotto e Picoli (2007) ao testarem *S. aureus* isolados de suabes nasal de indivíduos sadios. Porém se avaliado percentual de estirpes cujo comportamento foi intermediário, considerado resistente em testes para escolha do fármaco, a resistência a Eritromicina passa a ser apresentada por 86% das estirpes estudadas, assemelhando-se ao comportamento de 86,4%, dos isolados de queijos coalhos, testados por Rampini et al (2004).

O comportamento das cepas isoladas a ação da gentamicina opõem-se ao relatado por Oliveira et al. (2002), que confirmaram a eficiência do fármaco em 100% das cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de leite mastítico. Também não corrobora com a eficiência do fármaco relatada por Langoni et al. (2001), Brito et al. (2001) e Byarugaba, (2004). Dentre as estirpes isoladas, neste trabalho, 60 (57%) apresentaram-se sensíveis ao fármaco.

A Tetraciclina também não foi eficiente, inibindo 55 (52%) cepas isoladas, percentual abaixo dos relatados por Costa (2002), que confirmaram a resistência de 60% dentre as cepas de *Staphylococcus* coagulase positivos, isoladas em queijos comercializados no Maranhão. A eficiência do fármaco também não foi confirmada por Rampini et al.(2004), que relataram 81,8% das cepas testadas resistentes ao antimicrobiano.

O agente antimicrobiano Clorafenicol é apresentado como um dos mais eficientes ao combate dos *Staphylococcus*, como comprovado por Rampini et al.(2004), que relatou a inibição de 77,3% dos isolados de *S.aureus* testados. Freitas et al.(2005), relataram 83% das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva sensíveis ao fármaco. A eficiência do fármaco foi ainda maior no presente estudo, com inibição de 96 (90%) cepas testadas.

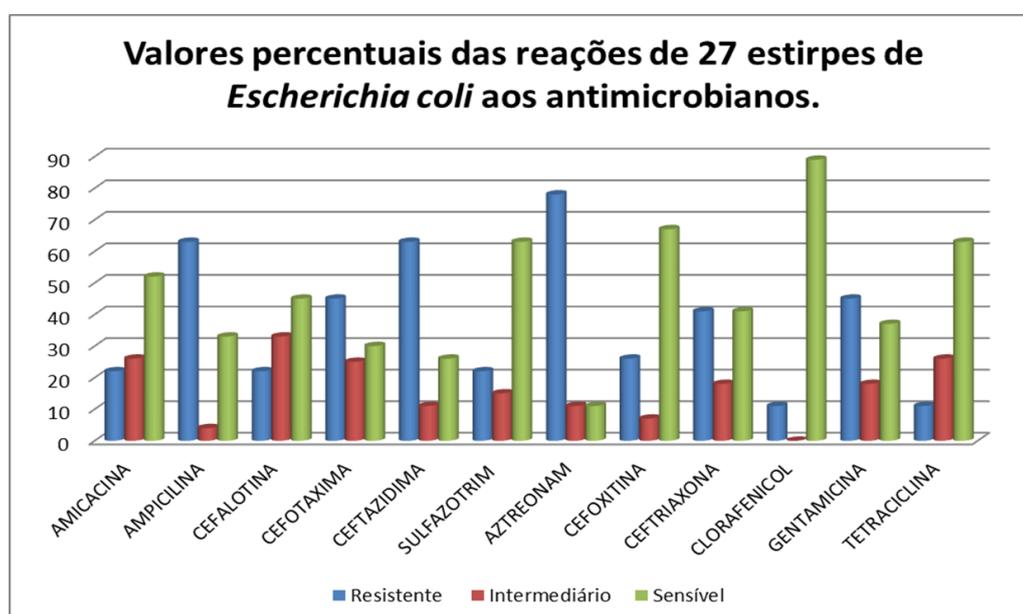
### 7.3.2 *E. coli*

A percentual de suscetibilidade das estirpes de *E. coli*, isoladas neste estudo, aos antimicrobianos testados pode ser avaliada na tabela 7 e confirmada no Gráfico 22. Na tabela 16 (APÊNDICES) observa-se o comportamento de cada estirpe aos fármacos testados.

**Tabela 7:** Valores percentuais do comportamento de 27 cepas de *E. coli* aos antimicrobianos testados.

ANTIMICROBIANO	COMPORTAMENTO DAS ESTIRPES DE <i>E. coli</i>		
	SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE
AMICACINA	14 (52%)	7 (26%)	6(22%)
AMPICILINA	9 (33%)	1 (4%)	17 (63%)
CEFALOTINA	12 (45%)	9 (33%)	6 (22%)
CEFOTAXIMA	8 (30%)	7 (26%)	12 (44%)
CEFTAZIDIMA	7 (26%)	3 (11%)	17 (63%)
SULFAZOTRIM	17 (63%)	4 (15%)	6 (22%)
AZTREONAM	3 (11%)	3 (11%)	21 (78%)
CEFOXITINA	18 (67%)	2 (7%)	7 (26%)
CEFTRIAXONA	11 (41%)	5 (18%)	11 (41%)
CLORAFENICOL	24 (89%)	0 (0%)	3 (11%)
GENTAMICINA	10 (37%)	5 (18%)	12 (45%)
TETRACICLINA	17 (63%)	7 (26%)	3 (11%)

**Gráfico 22:** Relação percentual das reações das estirpes isoladas de *E. coli* à ação dos antimicrobianos.



Nota-se a resistência superior a 50% das cepas testadas aos antimicrobianos Ampicilina, Ceftazidima e Aztreonam. Se considerado o comportamento intermediário como cepas possivelmente resistentes, os antimicrobianos Cefatonina, Cefotaxima, Ceftriaxona e Gentamicina, também foram ineficientes no combate da maioria das estirpes testadas. Os  $\beta$ -lactâmicos foram os antimicrobianos de menor eficiência ao combate das estirpes de *E. coli* isoladas neste estudo, o que pode ser consequência do uso indiscriminado desses fármacos nos tratamentos terapêuticos de animais e humanos.

O presente trabalho encontrou resultados distintos dos apresentados por Barreto et al.(2012), ao avaliarem o comportamento de cepas *E.coli* isoladas de leite “*in natura*”, em relação a ação dos antimicrobianos. Os autores relataram a resistência de 57,9% das estirpes a Tetraciclina, e a eficiência da Ampicilina em 89% dos isolados, enquanto que neste estudo a Penicilina foi um dos fármacos menos eficientes inibindo 30% apenas dos isolados, e somente 11% das cepas foram resistentes a tetraciclina.

A eficiência da Tetraciclina também foi confirmada por Campos et al. (2006) que confirmaram a sensibilidade de 23 (69,7%) e 23 (92%) dentre as estirpes isoladas de leite cru e queijos, respectivamente. Os autores observaram ainda a inibição pelo antimicrobiano de duas (66,7%) das estirpes *E coli* isoladas de cavidade nasal de manipuladores.

Quando avaliados o comportamento dos isolados a Gentamicina, o percentual de resistência encontrado neste estudo opõe-se aos relatados por Campos et al. (2006) que encontraram 33 (100%), 24(96%) e 7(87,5%) cepas isoladas de leite, queijo e de suabes das mão dos manipuladores, sensíveis ao fármaco. Barreto et al.(2012) também confirmaram a eficiência da Gentamicina em 63,2% das cepas de *E. coli* testadas.

O antimicrobiano mais eficiente no combate às cepas isoladas nesse estudo foi o Clorafenicol com inibição de 24(89%) cepas, seguido de Tetraciclina e Sulfazotrim, ambos com inibição de 17(63%) isolados. A eficiência do Clorafenicol também foram confirmadas por Barreto et al.(2012) para 89,5% das cepas testadas, enquanto que o Sulfazotrim inibiu 81% das cepas estudadas por Campos et al. (2006). Segundo Campos et al. (2006) a resistência aos antimicrobianos apresentada pelas estirpes de *E. coli* pode ser avaliada como resposta ao

tratamento de mastites se observadas as condições de susceptibilidades aos fármacos.

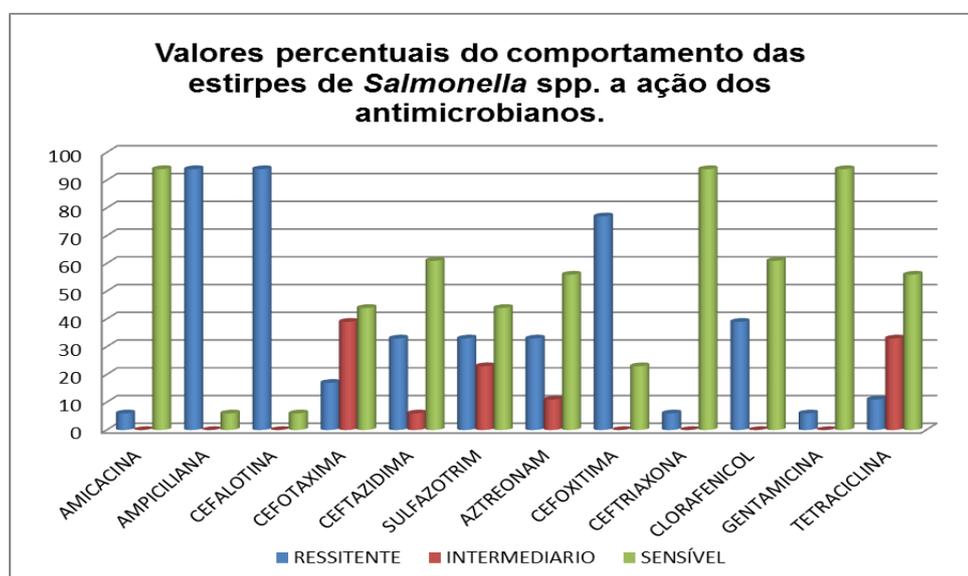
### 7.3.3 *Salmonella* spp.

A partir das nove amostras positivas para o microrganismo isolou-se 18 estirpes, as quais foram submetidas a testes de sensibilidade aos principais antimicrobianos utilizados para bactérias Gram-negativas. Na Tabela 9 e no Gráfico 23 podem ser avaliados os percentuais de amostras resistentes, sensíveis e com comportamento intermediário relação aos antimicrobianos. O comportamento de cada estirpe analisada pode ser observado na tabela 27 (APÊNDICES).

**TABELA 8:** Avaliação do comportamento das estirpes isoladas de *Salmonella* spp. em relação aos antimicrobianos testados.

ANTIMICROBIANOS	COMPORTAMENTO DAS ESTIRPES DE <i>Salmonella</i> spp.		
	SENSÍVEL	INTREMIARIO	RESISTENTE
AMICACINA(AMI 30)	17 (94%)	0 (0%)	1 (6%)
AMPICILINA(AMP10)	1 (6%)	0 (0%)	17 (94%)
CEFALOTINA (CFL30)	1 (6%)	0 (0%)	17 (94%)
CEFOTAXIMA (CTX30)	8 (44%)	7 (39%)	3 (17%)
CEFTAZIDIMA (CAZ30)	11(61%)	1 (6%)	6 (33%)
SULFAZOTRIM (SUT25)	8 (44%)	4( 23%)	6 (33%)
AZTREONAM (ATM30)	10 (56%)	2 (11%)	6 (33%)
CEFOXITINA (CFO30)	4( 23%)	0 (0%)	14 (77%)
CEFTRIAXONA(CRO30)	17 (94%)	0 (0%)	1 (6%)
CLORAFENICOL (CLO30)	11(61%)	0 (0%)	7 (39%)
GENTAMICINA (GEN10)	17 (94%)	0 (0%)	1 (6%)
TERTACICLINA (TET30)	10 (56%)	6 (33%)	2 (11%)

**Gráfico 23:** Relação percentual das reações das estirpes isoladas de *Salmonella* spp. em relação à ação dos antimicrobianos.



Em relação à Ampicilina o comportamento das cepas estudadas opõem-se aos relatados por Peresi et al. (2006) que confirmaram a sensibilidade de 100% das 30 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos alimentares no Estado de São Paulo. No entanto o comportamento verificado para a ação da Tetraciclina foi semelhante, com aproximadamente 50% das cepas sensíveis ao fármaco.

A suscetibilidade das cepas isoladas aos antimicrobianos Amicacina e Gentamicina assemelham-se aos relatados por Cortez et al. (2006), que avaliaram a suscetibilidade de cepas da bactéria isoladas em abatedouros de aves e confirmaram a eficiência do fármaco sobre 93% e 96% dos isolados. Cortez et al.(2006) também relataram a resistência de 25 (86,2%) cepas ao Aztreonam, o que não foi comprovado neste estudo.

Nenhuma das cepas isoladas neste estudo foi 100% sensível aos princípios antimicrobianos testados, sendo 94% das cepas, submetidas à ação dos fármacos, apresentaram resistência a três ou mais fármacos, o que dificulta as escolhas terapêuticas para o controle das infecções causadas pelo microrganismo, principalmente quando os afetados forem indivíduos mais susceptíveis conforme relatado por Franco e Landgraf (2003).

Andreotti e Nicodemo (2004) descreveram que a resistência das estirpes de *Salmonella* spp. tem influência de tratamentos terapêuticos utilizados no controle de infecções mamárias dos animais leiteiros, além do uso indiscriminado de fármacos de amplo espectro em infecções humanas. De acordo com os resultados do presente trabalho apenas Amicacina, Ceftriaxona e Gentamicina obteriam sucesso em tratamentos de patologias ocasionadas por esse microrganismo, uma vez que foram os únicos antimicrobianos entre os testados eficientes no combate as cepas analisadas.

Os princípios ativos testados nos isolados são os utilizados, com certa frequência, na terapêutica humana. Esses resultados servem de alerta, pois o uso indiscriminado de antibióticos em tratamentos de infecções e sua adição em rações animais, como promotores de crescimento, têm contribuído para a emergência de bactérias patogênicas resistentes, como *Salmonella* spp., que podem ser veiculadas em alimentos de origem animal e causar infecções em seres humanos.

#### 7.3.4 *Listeria* spp.

Na tabela 28 (APÊNDICES) pode ser observada a susceptibilidade de cada estirpes isoladas aos antimicrobianos, destacando o comportamento multirresistente de 100% das estirpes. Os fármacos Penicilina, Aztreonam, Cefoxitina e Gentamicina, foram os menos eficientes dentre os testados, enquanto que Tetraciclina, Clorafenicol apresentaram melhor ação antibacteriana (Tabela 9; Gráfico 24).

Quando avaliado o percentual de isolados resistentes à Penicilina, o valor encontrado neste trabalho foi inferior ao relatado por Prates (2010) após testarem a ação do mesmo fármaco sobre cepas de *Listeria* spp. isoladas de laticínios do Rio Grande do Sul- RS. Esses autores também relataram resistência de 70%, 90% e 100% das cepas aos fármacos Gentamicina, Tetraciclina e Clorafenicol, respectivamente, enquanto que neste trabalho foram encontrados para os mesmos fármacos percentuais de resistência iguais a 60%, 0% e 40%.

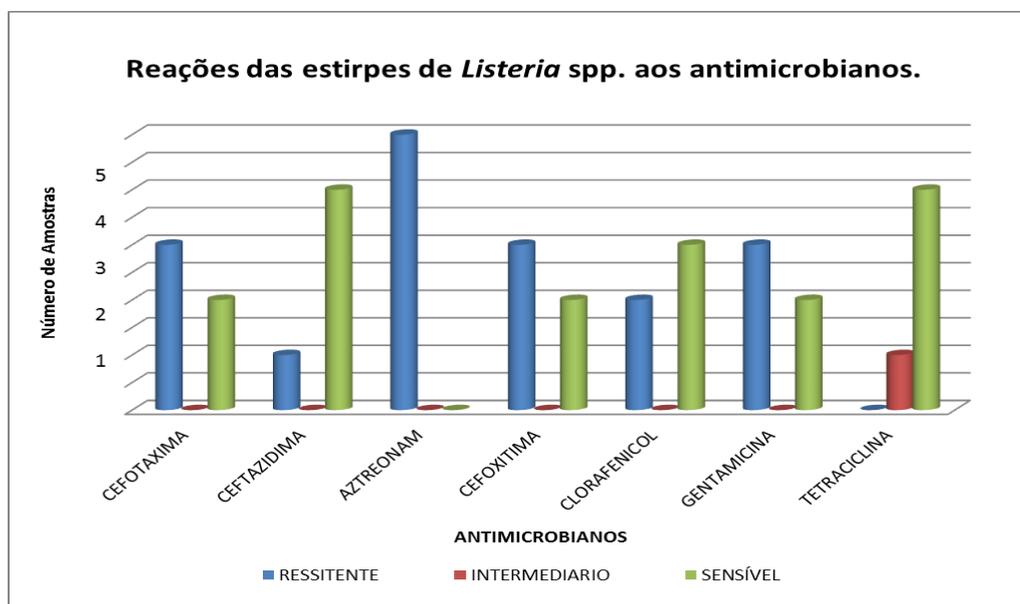
Os resultados deste estudo em relação a Tetraciclina e Penicilia corroboram com os relatados por Haraken et al. (2009) que ao testarem a suscetibilidade de cepas *Listeria* spp. isoladas de produtos lácteos observou a sensibilidade de 93% dos isolados a Tetraciclina enquanto que 90% foram resistentes a Penicilina.

Embora o número de isolados submetidos à ação dos fármacos tenha sido baixo, a avaliação dos resultados serve como um parâmetro para estudos da doença e do agente, na região onde foram coletadas as amostras. Dados da resistência das estirpes a Penicilina, por exemplo, são importantes, segundo Hof (2003), devido à utilização desse fármaco, como primeira escolha, ao combate a listeriose.

**Tabela 9:** Avaliação do comportamento das estirpes isoladas de *Listeria* spp. em relação aos antimicrobianos testados.

ANTIMICROBIANOS	Comportamento das estirpes de <i>Listeria</i> spp.		
	SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE
PENICILIA (PEN10)	2(40%)	0(0%)	3(60%)
TEICOPLAMINA (TEC30)	4(80%)	0(0%)	1(20%)
AZTREONAM (ATM30)	0(0%)	0(0%)	5(100%)
CEFOXITINA (CFO30)	2(40%)	0(0%)	3(60%)
CLORAFENICOL (CLO30)	3(60%)	0(0%)	2(40%)
GENTAMICINA (GEN10)	2(40%)	0(0%)	3(60%)
TERTACICLINA (TET30)	4(80%)	1(20%)	0(0%)

**Gráfico 24:** Relação das estirpes isoladas de *Listeria* spp. em relação à ação dos antimicrobianos.



É importante avaliar a multirresistência aos fármacos apresentada pelas cepas das bactérias patogênicas avaliadas devido à correlação desta com a virulência dos agentes. Baseando-se nos resultados encontrados nesta pesquisa (Tabela 10), o perfil de resistência aos antimicrobianos apresentados pelas estirpes testadas é considerado, conforme Dropa (2006), um desafio a Saúde pública, e tem

sido amplamente estudada, sendo que o monitoramento desta característica bacteriana serve de suporte para políticas públicas e colaboram com a escolha de medicamentos mais propícios ao tratamento de enfermidade tanto na medicina humana como na medicina veterinária. A multirresistência aos antimicrobianos testados dificulta o tratamento de possíveis infecções que estas bactérias possam vir a causar.

**Tabela 10:** Multirresistência das estirpes isoladas.

	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Listeria spp.</i>
Sensível a todos os Fármacos	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Resistente a um ou dois fármacos	4 (14%)	14 (13%)	1(6%)	0 (0%)
Multirresistencia*	24 (86%)	92 (87%)	17 (94%)	5 (100%)

\*Resistente a três ou mais antimicrobianos.

## 8 CONCLUSÕES

- ✓ As elevadas concentrações de bactérias do grupo coliformes evidenciam as condições impróprias de higiene das amostras analisadas, assim como as temperaturas aferidas no momento da colheita comprovam as inadequadas condições de conservação do produto.
- ✓ Com base nos resultados encontrados conclui-se que a comercialização de queijos minas frescal informais, em vias públicas da cidade de Volta Redonda-RJ, é motivo de preocupação para as autoridades sanitárias e de saúde da região por representar risco à saúde dos consumidores, devido à presença de bactérias patogênicas capazes de causar graves enfermidades em humanos.
- ✓ O comportamento multirresistente das estirpes patogênicas avaliadas aos antimicrobianos testados é preocupante, uma vez que o controle de possíveis enfermidades causadas por estes agentes etiológicos seria comprometido pela ineficiência dos principais fármacos disponíveis.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. D.; PENA, P. G. L. Feira livre e risco de contaminação alimentar: Estudo de abordagem etnográfica em Santo Amaro, Bahia, *Revista Baiana de Saúde Pública*, v. 35, n. 1, p.110-127, 2011.

ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A.; Ocorrência de coliforms fecais e *Escherichia coli* em queijo tipo minas frescal de produção artesanal comercializado em Poços de Caldas, MG. *Higiene Alimentar*, v.16, n 102 p. 71- 73, 2002.

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Potencial de transmissão de enfermidades pela carne, leite e derivados de caprinos e ovinos. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. v. 1, n. 2, p.37- 43, 2007

AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIRO, O. D.; NADER FILHO, A. FERREIRA, F. L.A.; BARROS, L. S. S. Ocorrência de *Staphylococcus* spp. em água utilizada em propriedades leiteiras do estado de São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol. 55, n. 5, p. 620-623, 2003.

AMARAL, L. A.; ROMANO, A. P. M.; NADER FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O. D. Qualidade da água em propriedades leiteiras como fator de risco a qualidade do leite e à saúde da glândula mamária, *Arquivo do Instituto Biológico*, v 71, n. 4 , p. 417-421, 2004.

AMASON, V. G. *Comércio ambulante de alimentos em Curitiba: Perfil de vendedores e propostas para programas de boas práticas higiênicas na manipulação de alimentos*. Curitiba, 2006. 63 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de Alimentos)-Setor de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ANDRADE, N. J. *Higiene na Indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos*. São Paulo: varela, 2008. 412p.

ANDRÉ, M. C. D. P. B.; SANTOS, P. P.; CAMPOS, M. R. H.; BORGES, L. J.; SERAFINI, A. B. Utilização do Antibiograma como Ferramenta de Tipagem Fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de manipuladores , leite cru e queijo minas frescal em Laticínio de Goiás, Brasil. *Brazian Journal of Veterinary Research and animal Science*, v. 43, p. 102-108, 2006.

ANDREOTTI, R.; NICODEMO, M. L. F. *Uso de antimicrobianos na produção de bovinos e desenvolvimento de resistência*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2004. 50p.

APPELBAUM, P. C., Microbiology of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Disease*, v.45, n.3, p.165-170, 2007.

ARAUJO, V. S.; PAGLIARES, V. A.; QUEIROZ, M. L. P.; FREITAS ALMEIDA, A. C. Occurrence *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, v.92, p.1172-1177, 2002.

ASSUMPÇÃO, E.G.; PICCOLI-VALLE, R.H.; HIRSCH, D.; ABREU, L. R. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, p. 366-370, 2003.

BARRETO, N. S. E.; SANTOS, G. C. F.; CREPALDI, A. L.; SANTOS R. R. Qualidade microbiológica e susceptibilidade antimicrobiana de leite *in natura* comercializado em Cruz das Almas, Bahia. *Ciências Agrárias*, v.33, p.1570-1574, 2007.

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*, v. 33, n. 6, p. 2315-2326, 2012

BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, E. H. F.; FIGUEIREDO, E. A. T. Microrganismos patogênicos em queijos coalhos produzidos no Ceará, Brasil. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v.21, n. 1, p.31-40, 2003.

BRANT, L. M. F.; FONSCCECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo de minas artesanal do Serro-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n. 6, p.1570- 1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal- RIISPOA*. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Portaria Nº 1.428, de 26 de novembro de 1993. *Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos*. Brasília, DF, 1993.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura. *Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos*. Portaria Nº146, de 7 de março de 1996. Brasília, DF, 1996.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. *Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal*. Brasília, DF, 1997.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria 1461 de 22 de dezembro de 1999.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. *Regulamento Técnico sobre os padrões Microbiológicos para alimentos*. Brasília-DF, 2001.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. *Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas e para controle de produtos de origem animal e água*. Brasília, DF, 2003.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento- MAPA. Instrução Normativa N°4, de 1 de março de 2004. *Oficializa a alteração do Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal*. Brasília-DF, 2004.

\_\_\_\_\_. Instrução Normativa N°68, de 12 de dezembro de 2006. *Oficializa os Métodos Analíticos oficiais físico-químicos para Controle de Leite e produtos Lácteos*. Brasília-DF, 2006.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos*. Brasília, Editora do Ministério da Saúde, 2010.158 p.

\_\_\_\_\_. *Dados Epidemiológicos – DTA- período de 2000 a 2011\**. Brasília- DF, 2011.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S.; CARMO, R. A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.5, p.10-17, 2001.

BYARUGABA, D.K. A review on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. *International Journal Antimicrobial Agents*, v.24, p.105-110, 2004.

CÂMARA, S. A. V.; AMARAL, G. B.; MULLER, M. T. Avaliação microbiológica de queijos tipo minas frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Higiene Alimentar*, v.16, p. 32-36, 2002.

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.

CARNEIRO, L. C. Avaliação de *Escherichia coli* em manipuladores de alimentos da cidade de Morrinhos-GO. *Vita et Sanitas*, v.2 n.2, p. 31-42, 2008.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of minas frescal cheese produced by diferente technological processes. *Food Control*, v.18, n.3, p.262-267, 2005.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios no Estado da Paraíba (Brasil). *Ciência e tecnologia de Alimentos*. v. 21, n. 3, p. 281-287, 2001.

CHALITA, M. A. N.; SILVA, R. O. P.; PETTI, R. H. V.; SILVAS, C. R. L. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijo no Brasil. *Informações Econômicas*, v. 39, n. 6, p. 78-87, 2009.

COSTA, F.N.; LIMA, R.M.S.; RABELO, R.N. Comportamento frente à ação de antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* isoladas de derivados lácteos. *Higiene Alimentar*, v.16, p.80-83, 2002.

CORTEZ, M. A. S; CORTEZ, N. M. S. *Qualidade do leite: Boas práticas agropecuárias e ordem higiênica*. Niterói: Ed. UFF, 2008. 77p.

CUNHA, M. L. R. S.; CALSOLARI, R. A. O.; ARAÚJO JUNIOR, J. P. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase negative Staphylococci. *Microbiology and Immunology*, v. 51, n. 4, p. 381-390, 2007.

DI GIACOMO, R. F.; KOEPESELL, T. D. Sampling for Detection of Infection or Disease in Populations. *Journal American of Veterinary Research*, v. 20, p. 176-179, 1986.

DROPA, M. *Caracterização genotípica de cepas da família Enterobacteriaceae produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo, 2006*. 116f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DUARTE, D. A. M.; SCHUCH, D. M. T.; SANTOS, S. B.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SILVA, J. V. D.; MOTA, R. A. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores Higiênico-Sanitários em quijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. *Arquivo Instituto Biológico*, v. 72, n. 3, p. 297-302, 2005.

FARIAS, A. X. et al. Avaliação da qualidade do leite, quanto à presença de resíduos de antibióticos. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 59, n. 33, p. 428-430, 2004.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, R. C. Pesquisa de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, 162-165, 2003.

FILHO, F. R. R. L.; POMBO, G. Aumenta o Consumo de Queijos no Brasil. *Carta Leite*, ed.105, ano. 6, setembro, 2010.

FLEMING, A. F. R. C. S. On the antibacterial action of cultures *Penicilium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *The British Journal of experimental pathology*, v.10, p.226-239, 1929. In: Bulletin of the world health organization, v.79, cap.8 2001.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre, RS: Artmed, 2002. 424p.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Ed. Atheneu, 2003. 182p.

- FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S. S. A.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J.; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. *Arquivo Instituto Biológico*, v.72, n.2, p.171-177, 2005.
- FURTADO, M. M. *Quesos Típicos de Latinoamérica*. São Paulo: Danisco. 2005, 192 p.
- GASANOV, U. Methods for the isolation and identification of listeria monocytogenes: a review. *Fems Microbiology Review*, Amsterdam, v. 29, p.851-875, 2005.
- GEIGL, E. M. Palaeogenetics of cattle domestication: Methodological challenges for the study of fossil bones preserved in the domestication centre in Southwest Asia. *Comptes Rendus Palevol*, v. 7, n. 2, p.99-119, 2008.
- GERMANO, P. M. L; GERMANO, M. I. S. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamentos de recursos humanos*. 4. ed. Barueri, SP: Manole, 2010. 1088p.
- GRANDI, A. Z.; ROSSI, D. A. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado na cidade de Uberlândia-MG. *Horizonte Científico*, v. 1, p. 7, 2007.
- GRANDO, W. F.; SCAPIN, D.; MALHEIROS, P. S.; ROSSI, E. M.; TONDO, E. C. Suscetibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de manipuladores de indústrias de laticínios. *Alimentos e Nutrição*,v.19, n.4, p. 467-471, 2008.
- GUERRA, M. M.; BERNARDO, F. M. A. Influência da microflora de cura na ocorrência de *Listeria* spp. em queijos tradicionais. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.100, p.185-188, 2005.
- HARAKEN, S.; SALEH, I.; ZOUHAIRI, O.; BAYDOUN, E.; ALWAN, N. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products, *Science of the Total Environment*, n.407, p.4022-4027, 2009.
- HARBUTT, J. *O Livro do Queijo*.São Paulo: Ed. Globo, 2010. 352 p.
- HOF, H., History and epidemiology of listeriosis. *Immunology and Medical Microbiology*, n.35, p.199–202, 2003.
- JANTZEN, M. M.; NAVAS, J. M.; PAZ, M. B.; PAZ, M.; NUNEZ, M.; SILVA, W. P. MARTINEZ.-SUAREZ, J. Evolution of ALOA plating médium for its suitability to recover high pressure-injured *Listeria monocytogenes* from ground chicken meat. *Letters in Applied Microbiology*, v.43, p. 313-317, 2006.
- JAY, J. M. *Microbiologia moderna dos alimentos*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed. 2005. 711p.

JUNQUEIRA, J. 1001 QUEIJOS, Passos Gourmet. Disponível em: <http://passosdegourmet.blogspot.com.br/2008/08/1001-queijos.html> Acesso em: 12 out. 2012.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae, coliforms and Escherichia coli as quality and safety indicators*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4. Ed. Washington: American public Health Association (APHA), 2001. p. 69-82.

LANGONI, H. DOMINGUES, P.F. BALDINI, S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v 13, n. 1, p. 51-54, 2006.

LEANDRO, J. J. Queijos: *Do Campo à Mesa*. São Paulo: Ed. Melhoramentos, 2008. 172p.

LI, X.; MEHROTRA, M.; GHIMIRE, S.; ADEWOYE L.  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary Microbiology*, v.121, p.197–214, 2007.

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.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; PEREIRA JUNIOR, F. N. Características físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.24, n.4, p.516-521, 2004.

MADIGAN, M. T; MARTINKO, J. M; DUNLAP, P.V; CLARK, D.P. *Microbiologia de Brock*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.1160p.

MANEGOTTO, F. R.; PICOLI, S. U. Staphylococcus aureus oxaciclina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade ( CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 39, n. 2, p. 147- 150, 2007.

McCALLUM, N.; BERGER-BACHI, B.; SENN, M.M. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, v.300, p.118-129, 2010.

MCLAUCHLIN, J. et al. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.92, p.15-33, 2004.

MEDEIROS, M. I. M.; SOUZA, L. C. Associação de agentes patogênicos isolados em análise Microbiológica da água, com a presença de mastite clínica ou subclínica, em vacas de propriedades leiteiras da Região de Cerqueira César – SP. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 33, n. 2, p. 580-585, 2009.

MIDURA, T.F.; BRYANT, R.G. *Sampling Plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis*. In: DOWNES, F.P; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.4.ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. cap. 2, p. 13-23.

NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. *Revista de Nutrição*, v.14, n.2, p.119-124, 2001.

NAWAZ, M.S.; ERICKSON, B. D.; KHAN, A. A.; KHAN, S. A.; POTHULURI, J. V.; RAFII, F.; SUTHUERLAND, J. B.; WAGNER, R. D.; CERNIGLIA, C. E. Human health impact and regulatory issues involving antimicrobial resistance in the food animal production environment. *Regul. Res. Perspect.*, v.1, n.1, p. 1-10, 2001.

NIJSTEN, R.; LONDON, N.; BOGAARD, A.; STOBBERINGH, V.D. Antibiotic resistance of enterobacteriaceae isolated from the faecal flora of fattening pigs. *Veterinary Quarterly*, v.15, n.4, p.152-157, 1993.

OLIVEIRA, A. A. F. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro frente a amostras de *Staphylococcus* spp isoladas de mastite subclínica bovina, no agreste maridional de Pernambuco. *A Hora Veterinária*, v. 22, n. 127, p. 8-10, 2002.

OLIVEIRA, S. D.; RODENBUSCH, C. R.; CÉ, M. C.; ROCHA, S. L. S.; CANAL, C. W. Evolution of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology*, Porto Alegre, RS. v. 36, p. 217-221, 2003.

OLIVER, S.P.; JAYARAO, B. M; ALMEIDA, R. A. Foodborne pathogenes in milk and dairy farm environment : Food Safty And Public Health Implications. *Foodborne Pathog Diseases*, v.2, p. 115-129, 2005.

ORDÓÑEZ, J. A. *Tecnologia de alimentos* – volume II: alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279p.

PANETO, B. R.; SCOCKEN-ITURRINO, R. P.; MACEDO, C.; SANTO, E.; MARIN, J. M. Ocorrência de *Escherichia coli* toxigênica em queijo-de-minas frescal no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.2, p.508-512, 2007

PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W. T.; FALEIRO, E. S. C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* spp. em queijo minas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.51, n.5, p.427-431 1999.

PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C et al. Queijo Minas tipo frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. *Higiene Alimentar*, v.15, p. 63-70, 2001.

PERESI, J.T.M.;ALMEIDA, I. A. Z. C.; CARDIGA, E. A.; MARQUES, D. F.; CARNICEL, F. A.; HOFFMANN, F. L. Suscetibilidade de antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Samonella* spp.. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.65, n.2, p. 111-117, 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.

PRATES, D. F. *Ocorrência, caracterização sorológica e avaliação do perfil de resistência a antibióticos em Listeria spp. isoladas em laticínios processadores de queijos no sul do Rio Grande do Sul*. Pelotas 2010. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)- Faculdade de Agronomia da Universidade federam de Pelotas. Pelotas, 2010.

RAMPINI, L. S.; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. *Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e Zootecnia*, v. 56, n. 1, p. 130-133, 2004.

RISTOW, A. M.; SILVA, M. J. A.; FERREIRA, L. M. F.; SOUZA, K.F.; CORTEZ, N. M. S.; MIRANDA, Z. B. Avaliação higiênico-sanitária das unidades de alimentação e nutrição localizada nos Campi de uma Universidade do Rio de Janeiro. *Higiene Alimentar*, v.21, n. 150, p.356, 2007.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo minas frescal . *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

SANGALETTI, N.; PORTO, E.; BRAZACA, S. G. C.; YAGASAKI, C. A.; DALLA DEA, R. C.; SILVA, M. V. Estudo da vida útil de queijo minas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, n.2, p.262-269, 2009.

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. *Arquivo Instituto Biológico*, v. 73, n. 2, p. 171-175, 2006.

SEBRAE. SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. *Série Mercado- Queijos Nacionais: estudos de Mercado*. 2008, 150p.

SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Protection*, v.61, n.3, p.354-356, 1998.

SILVA, W. P.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental sample of Brazilian dairy farms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 3, p. 103-106, 2000.

SILVA, Z. N.; CUNHA, A. S.; LINS, M. C.; CARNEIRO, L. A. M.; ALMEIDA, A. C. F.; QUEIROZ, M. L. P.; Isolamento e identificação sorológica de *Escherichia coli* enteropatogênica em leite pasteurizado. *Revista de Saúde Pública*. V.35, n.4, p. 375-379, 2001.

SILVA, J.A.; SILVA, D. *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. *Revista de Patologia Tropical*, v.34, n.3, p.175-196, 2005.

SILVA, R.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; MOURA, M. M. L.; CARVALHO, L. M. J.; WATER, E. H. M.; SANT'ANA, A. Pasteurized milk: efficiency of pasteurization and its microbiological conditions in Brazil. *Foodborne Pathogenes and Disease*, v.7, n.2, 2010.

SOTO, F. R. M.; CAZZOLA, C. P. B.; OLIVEIRA, E. H. S.; BERNARDI, F. et al..Aplicação experimental de um modelo de conduta de inspeção sanitária no comércio varejista de alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, n.2, p. 371- 374, 2009.

SOUSA, C. P. Segurança Alimentar E Doenças Veiculadas Por Alimentos: Utilização Do Grupo Coliforme Como Um Dos Indicadores De Qualidade De Alimentos. *Revista APS*, v.9, n.1, p. 83-88, 2006.

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

TEMELLI, S. Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. *Food control*, v. 17, p. 856-861, 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

TRINDADE, B. Queijo, Como se faz? Revista AquiVip. Disponível em: [http://www.revistaaquivip.com.br/noticias\\_exibe.php?id=NzQz](http://www.revistaaquivip.com.br/noticias_exibe.php?id=NzQz). Acesso em: 15 set 2012.

TRONCO, V. M. *Manual para inspeção do leite*. 4. ed. Santa Maria: UFSM, 2010.

VAN SCHAİK, G.; LOTEM, M.; SCHUKKEN, Y. H. Trends in somatic cells counts, bacterial counts, and antibiotic residue violations in New York State during 1999-2000. *Journal of Dairy Science*, v. 85, n. 4, p. 782-789, 2002.

VERAS, J.F.; SANTOS, D.A.; CARMO, L.S. et al. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil. *Higiene Alimentar*, v.17, p.218, 2003.

VERAS, J. F.; CARMI, L. S.; TONG, L. C.; SHUPP, J. W. ; CUMMINGS, C.; SANTOS, D. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CANTINI, A.; NICOLI, J. R.; JETT, M. A. Study of enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 12, n 4, p. 410-415, 2008.

VILELA, M.A.P.; REZENDE, P.R.; MEURER, V.M. Incidência de estafilococos produtores de coagulase em queijo Minas frescal comercializado na cidade de Juiz de Fora e região. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.56, p.140-143, 2001.

VLAEMYNCK, G. M.; MOERMANS, R. Comparison of LEB and Fraser enrichment broths for the detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in raw milk dairy products and environmental samples. *Journal of Food Protection*, v.59, n.11, p.1172-1175, 1996.

WONG, A. C. L.; BERGDOLL, M. S. *Staphylococcal food poisoning*. In: CLIVER, DO; REIMANN, H. P. *Foodborne Diseases*. 2. Ed. Amsterdam: Academic Press, p.231-248, 2002.

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v.37, n.3, p. 862-867, 2007.

ZEDER, M. A.; HESSE, B. The initial domestication of goats (*Capra hircus*) in the Zagros Mountains 10,000 years ago. *Science*, v.287, n.5461, p.2254-2257, 2000.

## 10 APÊNDICES

**Tabela 11:** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 1.

<b>BOX 1</b>						
<i>Amostra</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Coliformes 35°C (UFC/g·log)</i>	<i>Coliformes 45°C (UFC/g·log)</i>	<i>Staphylococcus coagulase positiva (UFC/g·log)</i>
<b>A1</b>	21,3	4,88	47,81	1.0 10 <sup>10</sup> - 10,1	2.0 10 <sup>9</sup> -9,30	4.8 10 <sup>6</sup> - 6,68
<b>B1</b>	15,5	5,78	54,91	1.4 10 <sup>8</sup> - 8,14	0	3.8 10 <sup>8</sup> - 8,57
<b>C1</b>	17,0	5,57	55,40	1.3 10 <sup>10</sup> - 10,1	0	3.2 10 <sup>8</sup> - 8,50
<b>D1</b>	10,3	5,41	57,39	3.3 10 <sup>6</sup> - 6,51	0	2.6 10 <sup>6</sup> - 6,41
<b>E1</b>	14,6	5,34	59,29	3.6 10 <sup>8</sup> - 8,55	0	2.2 10 <sup>6</sup> - 6,34
<b>F1</b>	15,6	5,20	55,50	4.1 10 <sup>7</sup> - 7,61	0	3.8 10 <sup>5</sup> - 5,57

**Tabela 12:** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 2.

<b>BOX 2</b>						
<i>Amostra</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Coliformes 35°C (UFC/g*log)</i>	<i>Coliformes 45°C (UFC/g*log)</i>	<i>Staphylococcus coagulase positiva (UFC/g*log)</i>
<b>A2</b>	21,9	5,42	50,49	2.5 10 <sup>8</sup> -8,39	0	5.0 10 <sup>6</sup> -6,69
<b>B2</b>	15,4	5,90	55,10	4.7 10 <sup>6</sup> -6,67	3.8 10 <sup>6</sup> -6,57	7.1 10 <sup>5</sup> -5,85
<b>C2</b>	24,1	4,79	52,52	2.6 10 <sup>5</sup> -5,41	2.1 10 <sup>5</sup> -5,32	8.1 10 <sup>5</sup> -5,90
<b>D2</b>	20,8	4,98	57,51	1.2 10 <sup>5</sup> -5,07	2.4 10 <sup>4</sup> -4,38	1.0 10 <sup>9</sup> -9,00
<b>E2</b>	15,8	5,36	60,10	6.1 10 <sup>5</sup> -5,78	1.2 10 <sup>5</sup> -5,07	4.0 10 <sup>4</sup> -4,60
<b>F2</b>	6,8	5,96	59,50	9.6 10 <sup>8</sup> -8,98	1.9 10 <sup>8</sup> -8,27	4.2 10 <sup>5</sup> -5,62

**Tabela 13:** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 3.

<b>BOX 3</b>						
<i>Amostra</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Coliformes 35°C (UFC/g*log)</i>	<i>Coliformes 45°C (UFC/g*log)</i>	<i>Staphylococcus coagulase positiva (UFC/g*log)</i>
<b>A11</b>	6,7	6,62	57,79	1.0 10 <sup>6</sup> -6,00	0	3.5 10 <sup>5</sup> -5,54
<b>B11</b>	4,1	6,78	56,79	1.2 10 <sup>6</sup> -6,07	0	1.3 10 <sup>5</sup> -5,11
<b>C11</b>	15,6	5,34	52,70	1.1 10 <sup>8</sup> -8,04	1.1 10 <sup>8</sup> -8,04	7.1 10 <sup>6</sup> -6,85
<b>D11</b>	1,8	6,69	59,70	1.0 10 <sup>7</sup> -6,00	2.0 10 <sup>6</sup> -6,30	1.1 10 <sup>7</sup> -7,04
<b>E11</b>	3,4	6,58	62,19	5.1 10 <sup>6</sup> -6,70	0	2.9 10 <sup>4</sup> -4,46
<b>F11</b>	4,3	6,60	59,01	9.0 10 <sup>5</sup> -5,95	0	1.6 10 <sup>6</sup> -6,20

**Tabela 14:** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 4.

<b>BOX 4</b>						
<i>Amostra</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Coliformes 35°C (UFC/g*log)</i>	<i>Coliformes 45°C (UFC/g*log)</i>	<i>Staphylococcus coagulase positiva (UFC/g*log)</i>
<b>A4</b>	14,5	5,15	54,80	5.0 10 <sup>6</sup> -6,69	5.0 10 <sup>6</sup> -6,69	4.0 10 <sup>7</sup> -7,60
<b>B4</b>	22,1	5,16	52,59	4.2 10 <sup>8</sup> -8,62	1.7 10 <sup>8</sup> -8,23	1.1 10 <sup>7</sup> -7,04
<b>C4</b>	11,3	5,20	55,00	8.5 10 <sup>7</sup> -7,92	5.1 10 <sup>7</sup> -7,70	3.1 10 <sup>7</sup> -7,49
<b>D4</b>	11,9	5,33	52,90	3.4 10 <sup>9</sup> -9,53	1.4 10 <sup>9</sup> -9,14	4.7 10 <sup>6</sup> -6,67
<b>E4</b>	13,1	5,52	54,70	2.1 10 <sup>9</sup> -9,32	0	1.6 10 <sup>6</sup> -6,20
<b>F4</b>	12,6	5,34	55,99	9.3 10 <sup>8</sup> -8,96	5.6 10 <sup>8</sup> -8,74	9.5 10 <sup>6</sup> -6,97

**Tabela 15:** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 5.

<b>BOX 5</b>						
<i>Amostra</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Coliformes 35°C (UFC/g*log)</i>	<i>Coliformes 45°C (UFC/g*log)</i>	<i>Staphylococcus coagulase positiva (UFC/g*log)</i>
<b>A5</b>	15,1	6,21	61,10	4.5 10 <sup>9</sup> -9,65	3.6 10 <sup>9</sup> -9,55	0
<b>B5</b>	13,1	6,44	61,69	1.7 10 <sup>7</sup> -7,23	0	1.4 10 <sup>6</sup> -6,14
<b>C5</b>	12,6	6,02	60,67	6.8 10 <sup>6</sup> -6,83	0	3.1 10 <sup>7</sup> -7,49
<b>D5</b>	19,2	5,45	56,01	1.3 10 <sup>10</sup> -10,1	7.7 10 <sup>9</sup> -9,88	3.4 10 <sup>8</sup> -8,53
<b>E5</b>	19,2	5,45	56,01	2.1 10 <sup>7</sup> -7,32	4.2 10 <sup>6</sup> -6,62	0
<b>F5</b>	7,7	6,23	62,70	5.6 10 <sup>8</sup> -8,74	0	5.6 10 <sup>6</sup> -6,74

**Tabela 16:** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 6.

<b>BOX 6</b>						
<i>Amostra</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Coliformes 35°C (UFC/g*log)</i>	<i>Coliformes 45°C (UFC/g*log)</i>	<i>Staphylococcus coagulase positiva (UFC/g*log)</i>
<b>A6</b>	18,1	5,21	56,80	4.5 10 <sup>9</sup> -9,65	0	2.9 10 <sup>8</sup> -8,46
<b>B6</b>	18,0	5,17	51,10	2.9 10 <sup>9</sup> -9,46	6.0 10 <sup>8</sup> -8,77	3.4 10 <sup>8</sup> -8,53
<b>C6</b>	13,5	5,07	50,54	9.4 10 <sup>10</sup> -10,9	7.5 10 <sup>10</sup> -10,8	4.5 10 <sup>10</sup> -10,6
<b>D6</b>	12,0	5,65	52,19	1.3 10 <sup>10</sup> -10,1	1.0 10 <sup>10</sup> -10	2.5 10 <sup>7</sup> -7,39
<b>E6</b>	8,4	6,43	54,30	4.9 10 <sup>8</sup> -9,69	1.0 10 <sup>8</sup> -8	5.5 10 <sup>7</sup> -7,74
<b>F6</b>	10,5	5,69	53,99	4.5 10 <sup>8</sup> -8,65	9.0 10 <sup>7</sup> -7,95	2.0 10 <sup>7</sup> -7,30

**Tabela 17:** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 7.

<b>BOX 7</b>						
<i>Amostra</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Coliformes 35°C (UFC/g*log)</i>	<i>Coliformes 45°C (UFC/g*log)</i>	<i>Staphylococcus coagulase positiva (UFC/g*log)</i>
<b>A7</b>	15,9	6,57	64,70	6.9 10 <sup>7</sup> -7,83	0	9.7 10 <sup>7</sup> -7,98
<b>B7</b>	12,2	6,56	60,09	3.3 10 <sup>7</sup> -7,51	0	6.2 10 <sup>5</sup> -5,79
<b>C7</b>	18,7	6,02	60,29	1.3 10 <sup>10</sup> -10,1	7.9 10 <sup>9</sup> -9,89	8.2 10 <sup>5</sup> -5,91
<b>D7</b>	16,3	5,60	56,70	4.5 10 <sup>7</sup> -7,65	2.7 10 <sup>7</sup> -7,43	3.1 10 <sup>6</sup> -6,49
<b>E7</b>	11,9	5,89	59,19	1.7 10 <sup>6</sup> -6,23	3.0 10 <sup>5</sup> -5,47	3.7 10 <sup>6</sup> -6,56
<b>F7</b>	12,2	5,73	61,29	6.5 10 <sup>6</sup> -6,81	1.3 10 <sup>6</sup> -6,11	1.0 10 <sup>6</sup> -6,0

**Tabela 18:** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 8.

<b>BOX 8</b>						
<i>Amostra</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Coliformes 35°C (UFC/g*log)</i>	<i>Coliformes 45°C (UFC/g*log)</i>	<i>Staphylococcus coagulase positiva (UFC/g*log)</i>
<b>A8</b>	10,3	6,51	64,21	1.5 10 <sup>9</sup> -9,17	5.8 10 <sup>8</sup> -8,76	1.4 10 <sup>5</sup> -5,14
<b>B8</b>	7,5	6,45	60,50	7.3 10 <sup>6</sup> -6,86	0	2.6 10 <sup>6</sup> -6,41
<b>C8</b>	9,9	6,22	63,19	4.0 10 <sup>6</sup> -6,60	0	9.0 10 <sup>5</sup> -5,95
<b>D8</b>	8,7	5,66	58,40	1.2 10 <sup>8</sup> -8,07	9.7 10 <sup>7</sup> -7,98	6.4 10 <sup>7</sup> -7,80
<b>E8</b>	13,3	5,68	61,41	1.9 10 <sup>6</sup> -6,27	3.8 10 <sup>5</sup> -5,57	1.6 10 <sup>7</sup> -7,20
<b>F8</b>	9,1	6,12	61,69	1.1 10 <sup>7</sup> -7,07	0	8.3 10 <sup>6</sup> -6,91

**Tabela 19:** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 9.

<b>BOX 9</b>						
<i>Amostra</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Coliformes 35°C (UFC/g*log)</i>	<i>Coliformes 45°C (UFC/g*log)</i>	<i>Staphylococcus coagulase positiva (UFC/g*log)</i>
<b>A9</b>	8,7	6,05	58,00	6.9 10 <sup>8</sup> -8,83	2.8 10 <sup>8</sup> -8,44	2.2 10 <sup>8</sup> -8,34
<b>B9</b>	10,4	6,3	55,80	9.0 10 <sup>5</sup> -5,95	5.0 10 <sup>5</sup> -5,69	2.3 10 <sup>5</sup> -5,36
<b>C9</b>	5,7	6,44	57,10	5.2 10 <sup>6</sup> -6,71	0	2.5 10 <sup>5</sup> -5,39
<b>D9</b>	10,3	6,25	55,40	4.7 10 <sup>8</sup> -8,67	0	3.1 10 <sup>8</sup> -8,49
<b>E9</b>	8,4	6,59	57,29	2.0 10 <sup>6</sup> -6,30	0	5.2 10 <sup>6</sup> -6,71
<b>F9</b>	9,2	6,85	58,49	9.6 10 <sup>5</sup> -5,98	0	1.1 10 <sup>6</sup> -5,04

**Tabela 20:** Valores referentes às amostras adquiridas no ponto de comercialização identificado como Box 10.

<b>BOX 10</b>						
<i>Amostra</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Coliformes 35°C (UFC/g*log)</i>	<i>Coliformes 45°C (UFC/g*log)</i>	<i>Staphylococcus coagulase positiva (UFC/g*log)</i>
<b>A10</b>	19,8	5,35	51,80	1.3 10 <sup>9</sup> -9,11	5.2 10 <sup>8</sup> -8,71	4.6 10 <sup>6</sup> -6,66
<b>B10</b>	21,2	5,35	55,39	2.1 10 <sup>7</sup> -7,32	0	5.8 10 <sup>5</sup> -5,76
<b>C10</b>	22,0	4,97	49,60	6.2 10 <sup>7</sup> -7,79	0	50.10 <sup>5</sup> -6,69
<b>D10</b>	22,5	5,58	58,29	3.9 10 <sup>6</sup> -6,59	3.1 10 <sup>6</sup> -6,49	4.3 10 <sup>7</sup> -7,63
<b>E10</b>	19,1	5,31	55,10	2.0 10 <sup>6</sup> -6,30	1.2 10 <sup>6</sup> -6,07	3.3 10 <sup>6</sup> -6,51
<b>F10</b>	22,5	5,27	54,90	7.9 10 <sup>5</sup> -5,89	4.7 10 <sup>5</sup> -5,67	1.2 10 <sup>5</sup> -5,07

**Tabela 21:** Médias dos valores encontrados nos boxes de comercialização.

BOX DE COMERCIALIZAÇÃO	Análises					
	Temperatura (°C)	pH	Umidade (%)	Coliformes totais (log UFC/g)	Coliformes termotolerantes (log UFC/g)	Staphylococcus coagulase positiva (log UFC/g)
BOX 1	15,7 ± 3,56 a (10,3 - 21,3) b	5,63 ± 0,30 (4,88 - 5,78)	55,04 ± 3,9 (47,8 - 59,2)	8,49 ± 1,39 (6,65 - 10,11)	9,3	7,01 ± 1,23 (5,57-8,57)
BOX 2	17,4 ± 6,25 (6,8 - 24,10)	5,40 ± 0,47 (4,79 - 5,96)	55,87 ± 3,86 (50,49 - 60,01)	6,72 ± 1,62 (5,07 - 8,98)	5,92 ± 1,53 (4,38 - 8,27)	6,28 ± 1,49 (4,60 - 9,00)
BOX 3	5,9 ± 4,97 (1,8 - 15,6)	6,43 ± 0,54 (5,34 - 6,78)	58,03 ± 3,19 (52,70 - 62,19)	6,46 ± 0,82 (5,95 - 8,04)	7,17 ± 1,23 (6,30 - 8,04)	5,86 ± 1,01 (4,46 - 7,04)
BOX 4	14,2 ± 3,99 (11,3 - 22,1)	5,28 ± 0,14 (5,15 - 5,52)	54,33 ± 1,31 (52,59 - 55,99)	8,51 ± 1,05 (6,69 - 9,53)	8,10 ± 0,95 (6,69 - 9,14)	6,99 ± 0,51 (6,20 - 7,60)
BOX 5	13,1 ± 3,85 (7,7 - 19,2)	6,00 ± 0,37 (5,45 - 6,44)	60,21 ± 2,37 (56,01 - 62,70)	8,31 ± 1,38 (6,83 - 10,11)	8,68 ± 1,79 (6,62 - 9,88)	7,22 ± 1,02 (6,14 - 8,53)
BOX 6	13,4 ± 3,96 (8,4 - 18,1)	5,53 ± 0,50 (5,07 - 6,43)	53,15 ± 2,33 (50,54 - 56,80)	9,75 ± 0,76 (8,65 - 10,97)	9,12 ± 1,28 (7,95 - 10,87)	8,34 ± 1,24 (7,30 - 10,65)
BOX 7	14,5 ± 2,83 (11,9 - 18,7)	6,06 ± 0,41 (5,60 - 6,57)	60,37 ± 2,62 (56,7 - 64,7)	7,69 ± 1,32 (6,23 - 10,11)	7,23 ± 1,95 (5,47 - 9,89)	6,45 ± 0,81 (5,79 - 7,98)
BOX 8	9,8 ± 1,97 (7,5 - 13,3)	6,10 ± 0,36 (5,6 - 6,51)	61,56 ± 2,04 (58,40 - 64,21)	7,43 ± 1,08 (6,27 - 9,17)	7,44 ± 1,65 (5,57 - 8,76)	6,57 ± 0,94 (5,14 - 7,80)
BOX 9	8,7 ± 1,71 (5,7 - 10,4)	6,41 ± 0,28 (6,05 - 6,85)	57,01 ± 1,20 (55,40 - 58,49)	7,07 ± 1,32 (5,95 - 8,83)	7,07 ± 1,94 (5,69 - 8,44)	6,55 ± 1,55 (5,05 - 8,49)
BOX 10	21,1 ± 1,44 (19,10 - 22,50)	5,30 ± 0,19 (4,97 - 5,58)	54,18 ± 3,04 (49,60 - 58,29)	7,16 ± 1,17 (5,89 - 9,11)	6,73 ± 1,35 (5,67 - 8,71)	6,39 ± 0,87 (5,07 - 7,63)

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão

<sup>b</sup> Valor mínimo – máximo

**Tabela 22:** Média dos valores encontrados nas 60 amostras avaliadas.

Análises					
Temperatura (°C)	pH	Umidade (%)	Coliformes totais (log UFC/g)	Coliformes termotolerantes (log UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (log UFC/g)
13,42 + 5,43 <sup>a</sup> (1,8 - 24,1) <sup>b</sup>	5,79 + 0,563 (4,79 - 6,85)	56,97 ± 3,78 (47,8 - 64,7)	7,75 ± 1,48 (5,07 - 10,97)	7,58 ± 1,66 (4,38 - 10,87)	6,75 ± 1,22 (4,46 - 10,65)

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão<sup>b</sup> Valor mínimo - máximo

**Tabela 23:** Reação das estirpes, de *Staphylococcus coagulase positiva*, isoladas nos 1º e 2º dias, aos antimicrobianos testados.

ESTIRPE	CLI 02	ERI15	OXA01	PEN10	TEC30	AMP10	CFL30	ATM30	CFO30	CRO30	CLO30	GEN10	TET30
A1(2)	R	I	S	R	S	S	R	R	R	R	I	R	R
A1(4)	S	S	I	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R
A2(1)	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
A2(2)	S	I	S	R	S	R	S	R	S	I	S	S	R
A2(3)	R	I	I	R	S	R	S	R	R	R	R	I	R
A2/4	R	R	I	R	S	R	S	R	R	I	S	S	I
A2(5)	R	I	S	S	S	S	S	R	R	I	S	I	R
A4/3	S	I	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S
A6/1	S	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S
A6/2	S	S	S	R	I	R	S	R	S	I	S	R	S
A6/3	S	I	I	R	I	R	S	R	S	I	S	S	S
A6/4	R	I	S	S	S	R	S	R	S	I	S	R	R
B6/4	R	I	R	R	S	R	S	R	S	I	R	S	R
A7/1	I	S	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S
A7/3	R	R	S	R	S	R	R	R	R	I	S	S	R
A10/4	R	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
A10/5	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
A11/1	S	R	S	R	S	R	S	R	R	I	S	R	I
A11/2	R	I	R	R	S	S	S	R	R	I	R	S	S
B2/2	R	S	S	R	I	S	S	R	S	I	S	S	R
B2/4	R	R	S	R	S	R	R	R	S	I	S	S	R
B4/1	I	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	I
B6/2	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	I
B6/3	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S	S	I
A6/5	S	I	I	R	I	R	S	R	S	I	S	R	S
B6/5	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
B7/4	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R
B7/5	R	R	S	R	S	R	R	R	R	I	S	S	I
B8/1	I	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	I
B8/2	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	I
B8/3	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
B10/1	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	I
B10/2	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	S
B10/3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R
B10/4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S

CLI 02: Clindamicina; ERI 15: Eritromicina; OXA 01: Oxaciclina; PEN 10: Penicilina G; TEC 30: Teicoplanina ; AMP 10: Ampicilina; CFL 30: Cefalotina; ATM 30: Aztreonam; CFO 30: Cefoxitina ; CRO 30: Ceftriaxona ; CLO 30: Clorafenicol ; GEN 10: Gentamicina; TET 30: Tetraciclina.

Susceptibilidade da estirpe frente ao antimicrobiano testado: R: Resistente; I: Intermediário; S: Sensível.

**Tabela 24:** Reação das estirpes, de *Staphylococcus coagulase positiva*, isoladas nos 3º e 4º dias de colheita, aos antimicrobianos testados.

ESTIRPE	CLI 02	ERI15	OXA01	PEN10	TEC30	AMP10	CFL30	ATM30	CFO30	CRO30	CLO30	GEN10	TET30
C1(1)	R	R	S	R	I	R	S	R	S	I	S	R	S
C1(2)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	I	S	S	S
C1(3)	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	I	I
C1(4)	R	R	S	S	I	R	R	R	S	S	S	R	S
C1(5)	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S
C2(1)	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S
C2/3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I
C2/4	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S	R	I
C2/5	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S	S	S
C4/1	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	I	S	R
C4/2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	S
C4/3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R
C4/4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	I	R
C4/5	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
C6/2	R	R	R	R	R	R	S	R	S	I	S	I	S
C6/4	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	I
C6/5	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	S
C8/2	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	S	R	S
C8/4	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	I
C8/5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
C9/1	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R
C9/2	R	R	S	R	I	R	S	R	S	I	S	S	S
C9/3	R	R	R	R	I	R	S	R	S	I	S	S	S
C9/5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
C11/1	S	S	S	R	I	R	S	R	S	S	S	S	S
C11/2	R	R	R	R	I	R	S	R	R	I	S	S	S
C11/3	R	R	R	R	S	R	R	R	R	I	S	S	S
C11/4	I	S	S	R	S	R	S	R	R	I	S	S	S
D2/1	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R
D2/2	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R
D4/4	I	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	I
D4/5	R	R	R	R	R	R	S	R	S	I	S	S	R
D6/1	R	I	R	R	S	S	S	R	R	I	S	R	S
D6/3	I	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
D6/4	R	I	S	S	S	R	S	R	R	I	S	R	R
D6/5	R	R	S	R	S	R	R	R	S	I	S	I	R

CLI 02: Clindamicina; ERI 15: Eritromicina; OXA 01: Oxaciclina; PEN 10: Penicilina G; TEC 30: Teicoplanina ; AMP 10: Ampicilina; CFL 30: Cefalotina; ATM 30: Aztreonam; CFO 30: Cefoxitina ; CRO 30: Ceftriaxona ; CLO 30: Clorafenicol ; GEN 10: Gentamicina; TET 30: Tetraciclina.

Susceptibilidade da estirpe frente ao antimicrobiano testado: R: Resistente; I: Intermediário; S: Sensível.

**Tabela 25:** Reação das estirpes, de *Staphylococcus coagulase* positiva, isoladas nos 5º e 6º dias de colheita, aos antimicrobianos testados.

ESTIRPE	CLI 02	ERI15	OXA01	PEN10	TEC30	AMP10	CFL30	ATM30	CFO30	CRO30	CLO30	GEN10	TET30
E4/1	I	I	I	R	S	R	S	R	S	S	S	R	S
E4/2	I	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
E6/2	I	S	I	R	S	R	S	R	S	I	S	S	S
E6/3	S	I	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S
E7/2	I	I	S	R	I	R	S	R	S	I	S	S	R
E7/5	I	S	S	R	I	S	S	R	S	S	S	S	S
F1(1)	R	R	S	S	S	S	S	R	R	I	S	I	R
F1(3)	S	I	S	R	S	R	S	R	S	I	S	S	S
F1(5)	I	I	R	R	S	R	S	R	S	I	S	S	R
F2(1)	S	I	S	R	S	R	S	R	S	I	S	S	S
F2(3)	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S
F2(4)	S	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	R	S
F4/1	R	I	R	R	R	R	S	R	S	I	S	S	S
F4/2	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	S	R	I
F4/3	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	S	R	I
F4/4	R	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R
F4/5	S	I	S	R	S	R	S	R	S	I	S	S	S
F5/1	R	I	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R
F5/2	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
F5/3	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
F5/4	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R
F6/1	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
F6/2	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
F6/3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R
F6/5	R	I	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S
F7/1	R	R	R	R	S	R	R	R	S	I	S	R	S
F7/2	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	I
F7/4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
F7/5	R	I	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S
F8/1	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	I
F8/3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
F10/1	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	I
F10/2	S	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	I
F10/3	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	I	S
F10/5	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S

CLI 02: Clindamicina; ERI 15: Eritromicina; OXA 01: Oxaciclina; PEN 10: Penicilina G; TEC 30: Teicoplanina ; AMP 10: Ampicilina; CFL 30: Cefalotina; ATM 30: Aztreonam; CFO 30: Cefoxitina ; CRO 30: Ceftriaxona ; CLO 30: Clorafenicol ; GEN 10: Gentamicina; TET 30: Tetraciclina.

Susceptibilidade da estirpe frente ao antimicrobiano testado: R: Resistente; I: Intrmediário; S: Sensível.

**Tabela 26:** Reação das estirpes de *Escherichia coli* aos antimicrobianos testados.

ESTIRPES	AMI 30	AMP10	CFL 30	CTX 30	CAZ 30	SUT25	ATM30	CFO30	CRO 30	CLO30	GEN 10	TET 30
A5(3)	I	S	R	I	R	S	R	S	I	S	S	I
A5(4)	S	R	R	I	S	S	S	I	S	S	R	S
A5(5)	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S
B6(5)	R	R	I	R	R	R	R	S	I	S	R	S
C2(2)	I	S	S	I	I	S	R	S	S	S	R	I
C2(3)	R	R	R	S	R	I	R	R	I	S	R	S
C2(4)	I	R	R	I	R	I	R	S	S	S	R	I
C2(5)	S	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	I
C6(3)	S	S	I	S	R	S	I	S	R	S	I	S
C6(4)	S	R	I	I	S	S	R	R	R	S	S	S
D2(4)	I	S	S	R	R	S	R	S	S	S	R	I
D5(2)	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S
D5(4)	R	S	I	R	S	S	I	S	I	S	R	S
D5(5)	I	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S
D7(3)	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S	I	S
D7(4)	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R
D7(5)	I	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S
D8(2)	S	S	S	S	I	S	R	S	S	S	R	S
D8(4)	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S
D10(1)	R	I	S	S	R	S	I	S	S	S	R	I
D10(2)	S	S	S	R	R	I	R	S	S	S	S	S
D10(4)	S	R	I	I	R	R	R	R	R	S	I	S
D10(5)	S	R	I	R	R	S	R	S	R	S	S	S
F7(2)	S	R	S	R	I	I	R	I	I	S	S	S
F10(1)	I	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	I
F10(4)	S	R	I	S	S	S	R	R	R	R	S	R
F10(5)	S	R	R	R	R	S	R	S	R	S	I	R

AMI 30: Amicacina; AMP 10: Ampicilina; CFL 30: Cefalotina; CTX 30: Cefotaxima; CAZ 30: Ceftazidima; SUT 25: Sulfazotrim; ATM 30: Aztreonam; CFO 30: Cefoxitina; CRO 30: Ceftriaxona ; CLO 30: Clorafenicol ; GEN 10: Gentamicina; TET 30: Tetraciclina.

Susceptibilidade da estirpe frente ao antimicrobiano testado: R: Resistente; I: Intermediário; S: Sensível.

**Tabela 27:** Comportamento das estirpes de *Salmonella* spp. em relação aos antimicrobianos testados.

ESTIRPES	ANTIMICROBIANOS											
	AMI 30	AMP10	CFL30	CTX30	CAZ30	SUT25	ATM30	CFO30	CRO30	CLO30	GEN10	TET30
A1(1) AVB-RAPPAPORT-TSI	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
A3(1) RAM-SELENITO-TSI	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S
A5(1) AVB-RAPPAPORT-LIA	S	R	R	I	R	S	I	S	S	S	S	S
A5(1) AVB-SELENITO-LIA	S	R	R	R	S	R	I	R	S	R	S	I
A5(1) RAM-SELENITO-TSI	S	S	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S
A5(2) AVB-SELENITO-LIA	S	R	R	I	S	S	S	R	S	S	S	S
A5(1) RAM-RAPPAPORT-LIA	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
A8(2) RAM-RAPPAPORT-LIA	S	R	R	S	R	I	R	R	S	S	S	I
A8(3) RAM-RAPPAPORT-LIA	S	R	S	I	S	I	S	R	S	S	S	S
A8(1) RAM-SELENITO-TSI	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A8(2) RAM-SELENITO-TSI	S	R	R	I	S	R	S	S	S	R	S	I
A8(1) AVB-RAPPAPORT-LIA	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
A8(2) AVB-RAPPAPORT-LIA	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	I
B2(1) RAM-SELENITO-LIA	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S
B5(2) RAM-RAPPAPORT-LIA	S	R	R	I	R	R	R	R	S	R	S	R
E9(1) RAM-SELENITO-LIA	S	R	R	I	S	I	S	R	S	R	S	R
B9(1) RAM-SELENITO-TSI	S	R	R	I	S	R	S	R	S	R	S	I
E10(3) RAM-SELENITO-LIA	S	R	R	S	I	R	R	R	S	R	R	I

AMI 30: Amicacina; AMP 10: Ampicilina; CFL 30: Cefalotina; CTX 30: Cefotaxima; CAZ 30: Ceftazidima; SUT 25: Sulfazotrim; ATM 30: Aztreonam; CFO 30: Cefoxitina; CRO 30: Ceftriaxona ; CLO 30: Clorafenicol ; GEN 10: Gentamicina; TET 30: Tetraciclina.

Susceptibilidade da estirpe frente ao antimicrobiano testado: R: Resistente; I: Intermediário; S: Sensível.

**Tabela 28:** Comportamento das estirpes de *Listeria* spp. em relação aos antimicrobianos testados.

ESTIRPES	PEN10	TEC30	ATM30	CFO30	CLO30	GEN10	TET30
A11(1)	R	S	R	S	R	S	S
B9 (1)	S	S	R	S	S	S	S
C9(1)	S	S	R	R	S	R	S
D1(1)	R	R	R	R	R	R	I
F11(1)	R	S	R	R	S	R	S

PEN 10: Penicilina G; TEC 30: Teicoplanina ; ATM 30: Aztreonam; CFO 30: Cefoxitina ; CLO 30: Clorafenicol ; GEN 10: Gentamicina; TET 30: Tetraciclina.

Susceptibilidade da estirpe frente ao antimicrobiano testado: R: Resistente; I: Intermediário; S: Sensível.

## 11 ANEXO

**Quadro 1:** Resultados das provas bioquímicas para identificação das estirpes de *Listeria* spp.

Prova	<i>L. Monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>
a-hemólise	+	+	-	-	+	-
Red- NO <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-
CAMPtest- <i>S. aureus</i>	+	-	-	-	+	-
CAMPteste- <i>R. equi</i>	-	+	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	+
Ramnose	+	+	Variável	Variável	-	-
Xilose	-	+	-	+	+	-
VM	+	+	+	+	+	+
Gram	+	+	+	+	+	+

FONTE: IN N°62. ADAPTADO RYSER E DONNELLY.

**Quadro 2:** Fórmula utilizada para contagens dos microrganismos quantitativos pesquisados nesse trabalho conforme consta na IN N°62 (BRASIL, 2003).

$$R = \frac{C \times c \times d}{r}$$

R = Resultado  
 C = número de colônias contadas  
 c = número de colônias confirmadas  
 r = número de colônias repicadas  
 d = diluição utilizada