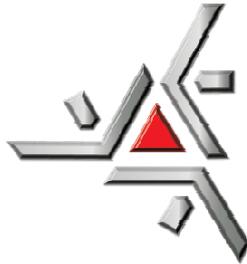


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ - UEM
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA



RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO
Área de Inspeção de Produtos de Origem Animal

**ORIENTADORA: PROF^a. Dr^a. PATRÍCIA MARQUES
MUNHOZ**

ACADÊMICO: RICARDO ANTONIO PILEGI SFACIOTTE

UMUARAMA
NOVEMBRO – 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ - UEM
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA



RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO

Relatório do Estágio Supervisionado
apresentado como requisito para
conclusão do curso de Medicina
Veterinária, sob orientação da Prof^a. Dr^a.
Patrícia Marques Munhoz.

UMUARAMA
NOVEMBRO – 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ - UEM
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA



RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO

Autor: Ricardo Antonio Pilegi Sfaciote

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Marques Munhoz

Aprovado em _____

Prof^a. Dr^a. Patrícia Marques Munhoz

Prof^a. Dr^a. Adriana Aparecida Pinto

Prof^a. Msc Juliana Scanavacca

DEDICATÓRIA

Dedico a conclusão desse trabalho às pessoas que foram indispensáveis na minha trajetória até aqui: Aparecida de Fátima Pilegi, minha mãe, Carlos Alberto Sfaciote, meu pai, e Francielli Cristini Sfaciote, minha irmã, que com muita luta, apoio, dedicação e amor me deram educação e forças sem as quais eu não teria chegado ao fim. Dedico também, aos meus padrinhos Anselmo Luis Sfaciote e Sirlei de Fatima Vicentini Sfaciote que sempre quando eu precisei estavam ao meu lado me apoiando em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Carlos Alberto Sfaciote e Aparecida de Fátima Pilegi, que sempre me apoiaram e incentivaram nas minhas escolhas, e que com certeza foram fundamentais nessa minha nova conquista.

A minha irmã, Francielli Cristini Sfaciote pelo companheirismo, conselhos e brincadeiras que foram de suma importância para o meu crescimento.

As minhas avós, Antonia Dei Pilegi e Geni Canassa Sfaciote que me deram muito amor e carinho.

Aos meus padrinhos, Anselmo Sfaciote e Sirlei Sfaciote, e minha tia Lourdes Dias de Oliveira que sempre foram como meus segundos pais durante toda minha vida.

A professora Patrícia Marques Munhoz, pela paciência, apoio e conselhos fundamentais para a conclusão desse trabalho.

A professora Sheila Rezler Wosiacki, que mesmo não podendo me orientar nessa reta final, contribuiu durante toda minha graduação para que hoje eu pudesse estar finalizando mais uma etapa da minha vida.

Aos meus amigos, Guilherme Amaro (Tody), Renata Ono (Rê), Susana Correa (Su) e Manoela Franco (Manu) pela amizade sincera que já dura mais de 8 anos, e mesmo tomando caminhos diferentes ela jamais enfraqueceu.

Aos meus amigos Heitor Kawase (Nokú), Lais Suzumura (Lá), Leandro Yamamoto (Japones), Wesley Gallo (Gallo), Diego Cazangi (Azia), Cybelle Narita (Cy), Jullyana Hernandez (Ju), Leandro Albrecht (Paiola), Patricia Ochi (Paty), Amanda Cruz (Mala), Naemi Kaneko (Na), Aquiles Muraro e Melca Altoé pela amizade, parceria, viagens, diversões e companheirismo.

Aos meus companheiros de turma, Fernanda Tavares, Isabella Goulart, Flávia Frantz, Vinicius Nogueira, Lis Elen Guse, Mayara Campos e Ligia Mendes por esses 5 anos que passamos juntos durante toda a graduação.

Aos meus demais parentes que também contribuíram para a finalização dessa nova etapa da minha vida e que com certeza sempre poderei contar.

EPÍGRAFE

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver
a vida passar.*

*É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se,
fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em
casa me esconder.*

*Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade
viver”.*

Martin Luther King

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA).....	14
FIGURA 2 - Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA).....	14
FIGURA 3 - Sala de extração de material genético.....	15
FIGURA 4 - Sala de lavagem de materiais.....	15
FIGURA 5 - Laboratório de Microbiologia.....	15
FIGURA 6 - Sala de esterilização de materiais onde se encontram três autoclaves.....	15
FIGURA 7 - Laboratório de Bacteriologia (LDBAC).....	15
FIGURA 8 - Laboratório de Biologia Molecular (BIOMOL).....	15
FIGURA 9 - Pirâmide que estima a proporção entre casos notificados e não notificados de DTA na Inglaterra.....	17
FIGURA 10 - Placa de petri contendo meio de cultura MLCB.....	27
FIGURA 11 - Placa de petri contendo meio de cultura XLD.....	27
FIGURA 12 - Placa de petri com meio de cultura Rambach. De vermelho, colônias típicas de <i>Salmonella</i> que crescem no agar.....	27
FIGURA 13 - Crescimento de <i>Salmonella</i> em meio de Cultura BPLS. As colônias são avermelhadas, pois a <i>Salmonella</i> não fermenta lactose e sacarose.....	27
FIGURA 14 - prova de soroaglutinação, que baseia-se na reação antígeno-anticorpo, com conseqüente aglutinação do antígeno frente ao anti-soro para <i>Salmonella</i> polivalente “O”....	27
FIGURA 15 - Esquema de PCR com as 3 fases (desnaturação, alineamento e extensão).....	29
FIGURA 16 - Fase de enriquecimento para <i>Salmonella</i> . Caldo Rappaport-Vassiliadis.....	31
FIGURA 17 - Fase de enriquecimento para <i>Salmonella</i> . Caldo Tetracionato.....	31
FIGURA 18 - Agar XLD com colônias pretas, típicas de <i>Salmonella</i>	31
FIGURA 19 - Agar XLD com crescimento de colônias, porém negativo para <i>Salmonella</i>	31
FIGURA 20 - Crescimento de colônias típicas de <i>Salmonella</i> em agar MLCB.....	32
FIGURA 21 - Agar TSI com resultado positivo para <i>Salmonella</i>	32
FIGURA 22 - Agar LIA com resultado positivo para <i>Salmonella</i>	32

FIGURA 23 - Visualização da extração de DNA em transluminador submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, sendo que a mínima presença de DNA indica uma realização correta da extração.....	33
FIGURA 24 - preparação do Mix (Kit para PCR e os primers) dentro da capela de fluxo contínuo.....	34
FIGURA 25 - Adição do DNA obtido da extração dentro do eppendorf contendo o Kit para a PCR e o primer em questão.....	34
FIGURA 26 - Termociclador.....	34
FIGURA 27 - Visor do Termociclador, contendo as etapas do PCR com o número de ciclos e a temperatura de cada uma delas.....	34
FIGURA 28 - Aparelho de eletroforese e a cuba para suporte do gel de agarose.....	35
FIGURA 29 - Cuba de suporte para o gel de agarose. Os círculos pretos indicam as canaletas onde eram postos as reações de PCR. As setas vermelhas indicam o quanto a reação já "correu" no gel.....	35
FIGURA 30 - Transluminador utilizado para visualização do gel com as reações logo após a saída da eletroforese.....	35
FIGURA 31 - Transluminador com maquina fotográfica acoplado à um notebook.....	36
FIGURA 32 - Resultado do PCR. A primeira canaleta do gel é o controle positivo e a segunda o negativo (água).....	36
FIGURA 33 - Resultado do PCR. A primeira canaleta contem um marcador onde cada banda representa uma quantidade específica de pares de base.....	36
FIGURA 34 - Resultado do PCR. O círculo preto mostra o aparecimento de bandas inespecíficas em 3 amostras.....	36
FIGURA 35 - Uma das propriedades selecionada para coleta das amostras na região da Zona da Mata em Minas Gerais com ordenha manual.....	46
FIGURA 36 - Uma das propriedades selecionada para coleta das amostras na região da Zona da Mata em Minas Gerais com ordenha mecânica.....	46
FIGURA 37 - Tanque de resfriamento para armazenar o leite de cabra coletado.....	47
FIGURA 38 - Coleta da amostra em garrafinhas de vidro.....	47
FIGURA 39 - Placa de Petrifilm utilizada para enumeração de bactérias aeróbias mesófilas.....	48
FIGURA 40 - Placa de Petrifilm utilizada para enumeração de coliformes totais e <i>E. coli</i> . Os pontos azuis indicam crescimento de <i>E. coli</i>	48

FIGURA 41 - Placa de Petrifilm utilizada para enumeração de coliformes e <i>E. coli</i> . A seta preta indica o crescimento de coliformes totais já que há a presença de gás. A seta branca não serve para contagem, pois não há formação de gás.....	48
FIGURA 42 - Placa de petrifilm utilizada para enumeração de Enterobactérias, sendo que a formação da coloração amarela ao redor da colônia indica o crescimento.....	48
FIGURA 43 - Placas para enumeração de bactérias psicrotróficas. A seta azul indica bactérias não proteolíticas, já que não há formação de halo. A seta vermelha indica a formação de halo e com isso a bactéria é classificada como proteolítica.....	49
FIGURA 44 - Bactérias classificadas como <i>Pseudomonas</i> proteolíticas já que houve a formação do halo em agar <i>Pseudomonas</i>	50
FIGURA 45 - Bactérias classificadas como <i>Pseudomonas</i> spp. já que não houve a formação do halo em agar <i>Pseudomonas</i>	50
FIGURA 46 - Crescimento de colônias não típicas de <i>Salmonella</i> em agar XLD, sendo o resultado negativo.....	50
FIGURA 47 - Crescimento de colônias típicas de <i>Salmonella</i> em agar MLCB, porém, após realizado o teste de aglutinação, o resultado foi negativo.....	50
FIGURA 48 - <i>Bag</i> estéril contendo 225 mL de TEB mais 25 mL de leite de cabra (amostra) sem o suplemento para a <i>Listeria</i>	51
FIGURA 49 - <i>Bag</i> estéril contendo 225 mL de TEB mais 25 mL de leite de cabra (amostra) contendo o suplemento seletivo de <i>Listeria</i> SR0141E.....	51
FIGURA 50 - Crescimento da ATCC 7644 (<i>Listeria monocytogenes</i>) em agar Palcam (controle).....	51
FIGURA 51 - Crescimento da ATCC 7644 (<i>Listeria monocytogenes</i>) em agar Oxford (controle).....	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Nomenclatura anterior e atual das subespécies que compõem a <i>Salmonella enterica</i>	22
TABELA 2 - Característica das colônias de Salmonella em cada um dos agares que podem ser utilizados para sua identificação de acordo com a Instrução Normativa nº 62.....	26
TABELA 3 - Efetivo e Ranque dos maiores rebanhos caprinos no mundo.....	39
TABELA 4 - Produção mundial de leite de cabra.....	40
TABELA 5 - Critérios microbiológicos e tolerância impostos pela Instrução Normativa Nº 37 ao leite de cabra pasteurizado e esterilizado.....	41

LISTA DE ABREVIACÕES

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APT – Água Peptonada
BIOMOL – Laboratório de Biologia Molecular
BPLS – Agar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose
CDC – Center for Disease Control and Prevention
CFSAN – Center for Food Safety and Applied Nutrition
DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos
DVA – Doenças Veiculadas por Alimentos
EFSA – European Food Safety Authority
LDBAC – Laboratório de Bacteriologia
LIA – Agar Lisina Ferro
LIPOA – Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MKTTn – Caldo Tetrionato Muller-Kauffmann com Novobiocina
MLBC – Agar Mannitol Lysine Crystal Violet Brilliant Green
MVPSP – Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública
OIE – Organização Internacional de Epizotias
OMS – Organização Mundial da Saúde
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
RV – Caldo Rappaport-Vassiliadis
SC – Caldo Selenito Cistina
SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde
TEB – Caldo de enriquecimento para Listeria
TSA-YE – Agar Triptona de Soja suplementado com Extrato de Levedura
TSB-YE – Caldo Triptona de Soja suplementado com Extrato de Levedura
TSI – Agar Tríplice Açúcar Ferro
TT – Caldo Tetrionato
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UFV – Universidade Federal de Viçosa
VE-DTA – Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos
VNC – Viáveis não cultiváveis
XLD – Agar Xilose Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	14
3 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	16
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
4.1 Doenças transmitidas por alimentos (DTA).....	17
4.2 Principais Fatores que causam surtos de DTA.....	19
4.3 <i>Salmonella</i> spp.....	20
4.3.1 Características gerais.....	20
4.3.2 Nomenclatura.....	21
4.3.3 Epidemiologia.....	22
4.3.4 Metodologias de detecção de <i>Salmonella</i>	23
4.3.4.1 Microbiologia Convencional.....	24
4.3.4.2 PCR.....	28
5 ACOMPANHAMENTO NO ESTÁGIO.....	30
5.1 Introdução ao projeto de mestrado.....	30
5.1.1 Realização do PCR.....	33
5.2 Conclusão.....	37
6 LEITE DE CABRA.....	38

6.1 Revisão Bibliográfica.....	38
6.1.1 Introdução.....	38
6.1.2 A caprinocultura leiteira.....	38
6.1.3 Instrução Normativa nº 37/2000.....	40
6.1.4 Principais microrganismos do leite cru.....	42
6.1.5 <i>Pseudomonas</i> sp.....	44
6.2 Acompanhamento.....	45
6.2.1 Apresentação do projeto de mestrado.....	45
6.2.2 Materiais e Métodos.....	45
6.2.2.1 Coleta de amostras e diluições.....	46
6.2.2.2 Análises microbiológicas.....	47
6.3 Conclusão.....	52
7 CONCLUSÃO GERAL.....	53
8 REFERÊNCIAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

O estágio foi realizado na Universidade Federal de Viçosa na cidade de Viçosa - MG, com acompanhamento na área de Inspeção de Produtos de Origem Animal, no período do dia 11 de Julho de 2011 a 23 de Setembro de 2011, perfazendo um total de 360 horas, sob orientação da Professora Dra. Patrícia Marques Munhoz e supervisão do Professor Dr. Luis Augusto Nero.

O estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária tem como objetivo complementar os conhecimentos adquiridos na faculdade e aproximar o acadêmico da vida profissional, com a rotina prática. Permite-nos comparar diferentes formas de atuação e pontos de vista, que somados aos conceitos teóricos pré-formados, moldam uma forma pessoal de prática profissional.

A Inspeção de Produtos de Origem Animal foi a minha área de escolha por ser uma área muito importante para a saúde pública em que o veterinário se encaixa desde a criação do animal até o produto que chega ao consumidor, pois não há um produto de boa qualidade se não houver uma criação bem sucedida.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) é localizado na Avenida Peter Henry Rolfs, sem número, Campus Universitário, na cidade de Viçosa – MG.

O LIPOA se encontra dentro do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública (MVPSP) sendo designado para: aulas práticas de duas disciplinas do curso de Medicina Veterinária (“Inspeção de carnes”, lecionada pelo professor Paulo Sergio de Arruda Pinto, e “Inspeção de leite”, lecionada pelo professor Luis Augusto Nero); serve de suporte para as atividades de pós-graduação (mestrado e doutorado), projetos de extensão e projetos de iniciação científica, além de disponibilizar suas dependências para estágios curriculares e extracurriculares.

As pessoas envolvidas com o LIPOA são basicamente médicos veterinários que cursam o programa de pós-graduação, servidores públicos, técnicos de laboratórios, alunos de graduação, estagiários da própria UFV e de outras instituições, além dos dois professores responsáveis pelo laboratório.

Além do LIPOA (Figuras 1 e 2), o MVPSP possui outras instalações que são de uso comum para as áreas do setor, tais como: sala de extração de material genético (Figura 3), sala de lavagem de matérias (Figura 4), sala onde se encontra três autoclaves para esterilização de materiais (Figura 6), Laboratório de Microbiologia (Figura 5) e o Laboratório de Bacteriologia (LDBAC) (Figura 7). Outra área de uso, porém que não faz parte do MVPSP, é o Laboratório de Biologia Molecular (BIOMOL) (Figura 8).



FIGURA 1: Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA).
FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 2: Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA).
FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 3: Sala de extração de material genético.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 4: Sala de lavagem de materiais.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 5: Laboratório de Microbiologia.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 6: Sala de esterilização de materiais onde se encontram três autoclaves.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 7: Laboratório de Bacteriologia (LDBAC).
FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 8: Laboratório de Biologia Molecular (BIOMOL).
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o período de estágio, as atividades desenvolvidas incluíram: lavagem e esterilização de materiais; preparações de meios de cultura, caldos de pré enriquecimento e enriquecimento; extração de DNA; estocagem de culturas; preparação de gel de agarose; realização de PCR; diluição de *primers*; corrida de gel de agarose em eletroforese; identificação de patógenos em leite de cabra (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Pseudomonas* spp); identificação de patógenos em carnes (*Salmonella* spp, *L. monocytogenes*, *E. coli*); análises microbiológicas de carne, leite de cabra e leite de vaca (coliformes totais e *E. coli*, enterobactérias, bactérias aeróbios mesófilas); coleta de leite de cabra em propriedades na cidade de Muriaé – MG e região; swab de carcaças bovinas em frigorífico; análises físico-químicas de leite de vaca; pesquisa de *Salmonella* spp em leite de vaca, preparação da escala de MachFarland; testes bioquímicos para identificação de *Pseudomonas* spp (coloração de gram, teste da oxidase e glicose); identificação de atividade proteolítica de *Pseudomonas* spp, além de verificação da ação de ácidos (ácido lático e ácido acético) na inibição de *Salmonella* spp em carne bovina.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs)

As síndromes resultantes da ingestão de alimentos ou água contaminados com agentes biológicos ou químicos (bactérias, vírus, príons, parasitas, toxinas, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados) são conhecidas como Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) ou simplesmente toxinfecções (JAY, 2005; SILVA, 2008; BUZBY e ROBERTS, 2009), sendo que muitos estudos apontam as bactérias como as principais causadores de DTAs (WELKER et al, 2010).

As DTAs são conhecidas desde tempos remotos, entretanto, foi somente no século XIX, com as descobertas de Louis Pasteur, que ficou estabelecida a relação entre microrganismos e a deterioração dos alimentos, incluindo a capacidade destes de causarem doença (BRASIL, 2005).

Se comparado com o total de ocorrências, o número de surtos notificados de DTAs representa apenas a ponta de um *iceberg* (FORSYTHE, 2000). Wleeler e colaboradores (1999) constataram que na Inglaterra, para cada caso notificado, existiam na época outros 136 casos não notificados na comunidade, como mostra a figura 9.



Fonte: adaptado de WLEELER et al, 1999.

FIG
UR
A 9:
Pirâmide
e
que
esti
ma
a
pro
porç
ão
entr
e
caso

s notificados e não notificados de DTA na Inglaterra.

No Brasil, assim como na maioria dos países, os surtos notificados se restringem àqueles que envolvem um maior número de pessoas ou quando a duração dos sintomas é mais prolongada e, sendo assim, a ajuda do médico é solicitada (CARMO et al, 2005). Os sintomas

mais comuns de DTAs são náuseas, diarreia, vômito, dor no estômago, podendo ou não ocorrer febre. A duração dos sintomas pode variar de algumas horas até mais de cinco dias, dependendo do agente envolvido, da quantidade do agente no alimento e do estado físico do paciente. Dependendo do agente etiológico, o quadro clínico pode ser mais prolongado e mais grave, podendo apresentar desidratação grave, diarreia sanguinolenta, insuficiência renal aguda e insuficiência respiratória (CARMO, et al., 2005; MÜRMAN et al., 2008; FORSYTHE, 2010).

Em muitos surtos, a dose infectante de patógenos é menor que a necessária para degradar os alimentos e, por isso, eles permanecem com suas características organolépticas normais, ou seja, possuem sabor, odor e aparência de um alimento de boa qualidade. Devido a esses fatos, a rastreabilidade dos alimentos causadores de surtos é dificultada, uma vez que os consumidores não conseguem associar o alimento responsável com a doença observada (FORSYTHE, 2010).

As DTA podem dar origem a surtos, que de acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) (2006), são episódios em que duas ou mais pessoas apresentam doenças semelhantes após ingerirem alimentos contaminados com microrganismo patogênico ou suas toxinas, configurando uma origem comum.

A investigação de um surto de DTAs se embasa em três eixos principais: (1) a investigação epidemiológica propriamente dita, através de formulários com entrevistas aos envolvidos no surto para identificar o veículo de transmissão e o provável agente etiológico; (2) a investigação laboratorial, com a coleta de amostras clínicas de pacientes, alimentos e água, para confirmação do agente etiológico; e (3) a investigação ambiental, ou seja, averiguação do local de ocorrência do surto para se detectar os fatores contribuintes que possibilitaram o surgimento do mesmo (SANTA CATARINA 2006).

A identificação e investigação de surtos causados por alimentos é um componente essencial na prevenção e no controle das DTAs. Surtos sem esclarecimento etiológico geralmente têm como causas a notificação tardia, a ausência de coleta de amostras clínicas e/ou de alimentos em tempo oportuno, ou testes laboratoriais inadequados (EDUARDO, KATSUYA e BASSIT, 2003).

A maioria dos surtos alimentares ocorre devido a associação entre o consumo de alimentos contaminados através da manipulação inadequada e a má conservação ou distribuições impróprias do produto (GREIG e RAVEL, 2009). Alimentos que possuem baixa quantidade do agente patogênico e que, deste modo, não causariam surtos alimentares, podem possuir aumentada significativamente a chance de causar um surto quando conservados em

condições que favorecem a multiplicação do microrganismo. Por outro lado, algumas bactérias como *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 apresentam doses infectantes muito baixas, permitindo que a simples contaminação ou a ausência de alguma etapa de eliminação do microrganismo seja o suficiente para causar o surto (CDC, 2006; GREIG e LEE, 2009).

Com o crescimento do comércio internacional e a facilidade de deslocamento da população, houve um aumento e uma aceleração da disseminação de agentes patogênicos e contaminantes em alimentos, aumentando assim a vulnerabilidade da população às DTAs. Deste modo, surtos locais de DTAs têm se tornado uma ameaça potencial para o mundo todo (TAUXE et al., 2010).

A identificação de um único ingrediente alimentar contaminado pode acarretar na retirada de toneladas de produtos alimentícios no mundo todo, com consideráveis perdas econômicas na produção e embargo nos negócios (TAUXE et al., 2010). Por esses motivos, os países acabaram percebendo a necessidade e a importância de um sistema de vigilância e da adoção de medidas para garantir a segurança dos alimentos e para identificar os alimentos envolvidos nos surtos de DTAs (HENAO et al., 2010). No Brasil, em 1999, a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), do Ministério da Saúde, desenvolveu em parceria com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Instituto Pan-Americano de Alimentos, da Organização Pan-Americana da Saúde, o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VE-DTA) com o intuito de reduzir a incidência das DTA no Brasil (BRASIL, 2007).

4.2. Principais Fatores que causam surtos de DTA

Os fatores que contribuem para a ocorrência de DTAs podem ser agrupados em: (1) aqueles que permitem a proliferação do patógeno; (2) aqueles que permitem a sobrevivência do patógeno nos alimentos; e (3) aqueles que influenciam na contaminação dos alimentos (CDC, 2006).

O prolongado tempo de exposição dos alimentos à temperatura ambiente é um dos principais motivos apontados no envolvimento da ocorrência de surtos, sendo considerado como um importante fator que contribui para a proliferação do patógeno. Já em relação aos fatores de sobrevivência dos patógenos, os mais citados são o tempo e a temperatura de cozimento quando insuficientes durante a cocção dos alimentos (TAUXE, 2002; CDC, 2006; GREIG e LEE, 2009). Como exemplo de cozimento insuficiente, foi relatado um surto de

gastroenterite, causada por *E. coli* enterotoxigênica e *Salmonella* Anatum, em novembro de 2006, afetando 200 alunos e professores após um jantar em uma escola de ensino médio em Copenhague, Dinamarca (PAKALNISKIENE et al., 2009).

Tem-se também que o contato entre a mão do manipulador e o alimento foi o principal fator de contaminação relatado em estudos (CDC, 2006), sendo que uma efetiva lavagem de mãos pode evitar a transmissão das infecções entéricas (GREIG e LEE, 2009). Por ser um microrganismo encontrado comumente na pele e nas mucosas do trato respiratório superior, o *Staphylococcus aureus* é o principal agente envolvido em surtos associados à manipulação inadequada de alimentos, ainda mais pelo fato desse microrganismo produzir enterotoxinas termotolerantes, ou seja, que podem resistir aos processos de aquecimentos (JAY, 2005; MICHELIN et al., 2006; PIGOTT, 2008),

4.3. *Salmonella* spp

4.3.1. Características gerais

As salmonelas são bacilos gram negativos pequenos, seu tamanho varia de 0,3 a 1,0um x 1,0 a 6,0um e são pertencentes à família Enterobacteriaceae. Quando portadores de flagelos peritricos, dizemos que os sorotipos são moveis; entretanto, alguns sorotipos não possuem flagelos e por isso são classificados como sendo imóveis (SILVA, 2000; KORSAK, CLINQUART e DAUBE, 2004). São aeróbicos e anaeróbicos facultativos não esporulados e o metabolismo de glicose e outros carboidratos resulta na produção de ácido e geralmente gás. As bactérias desse gênero são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono; produzem catalase e H₂S; não produzem oxidase, indol e acetoina; não hidrolisam uréia, mas descarboxilam lisina e ornitina (D'AOUST e MAURER, 2007).

As salmonelas são mesófilas, tendo como temperatura ótima para o seu desenvolvimento 35° C a 40° C, porém, alguns sorovares têm propriedades psicrótróficas podendo se multiplicar em temperaturas de refrigeração de 2° C a 4° C; existem ainda aqueles sorovares que são capazes de se multiplicar em temperaturas mais elevadas (≤ 54° C). São microrganismos sensíveis ao calor e geralmente são destruídos pelo aquecimento a 60° C, por 15-20 minutos. O congelamento provoca uma redução significativa do número de células viáveis, mas não proporciona a destruição completa do microrganismo (D'AOUST e MAURER, 2007; BAILEY et al., 2010).

Quando as condições do meio não são favoráveis à sua sobrevivência, algumas bactérias têm a capacidade de entrar em um estado fisiológico de latência, no qual perdem a capacidade de serem cultivadas, apesar de permanecerem viáveis (Viáveis Não Cultiváveis -

VNC) (OLIVER, 2005). Alguns fatores presentes nos alimentos, como concentrações altas de sais, temperatura ou pH baixos, escassez de nutrientes e presença de antimicrobianos, podem desencadear o estado VNC (GUPTE et al., 2003; ROWAN, 2004). Entretanto, as bactérias patogênicas, como *Salmonella* spp, mesmo nesse estado, podem manter seus fatores de virulência, e apesar de não serem detectadas pelos métodos convencionais de cultivo microbiológico, representam um potencial risco à saúde dos consumidores (PANUTDAPORN et al., 2006).

Existem, atualmente, mais de 2.610 sorovares de *Salmonella* spp. (GUIBOURDENCHE et al., 2010). Suas fórmulas antigênicas são definidas e gerenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) através do *Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella*, no Instituto Pasteur, França. O método utilizado na caracterização de *Salmonella* spp. é a sorotipagem dos isolados de acordo com o esquema White-Kauffmann-Le Minor, no qual cada sorovar é caracterizado pela expressão combinada dos antígenos somáticos (O) e flagelares (H). Na maioria dos países, a sorotipagem fica restrita a laboratórios de referência, aos quais os laboratórios clínicos e de microbiologia de alimentos enviam seus isolados de *Salmonella* spp. Tal constatação resulta no fato de que a sorotipagem, principalmente dos sorovares menos abundantes, consome tempo e recursos, e a complexidade do sistema limita sua aplicação (LIM et al., 2005; RASSCHAERT et al., 2005).

4.3.2. Nomenclatura

A classificação do gênero *Salmonella* spp é bastante complexa e, por isso, controversa, o que fez com que surgissem diversas nomenclaturas por vários anos (OIE, 2004). A nomenclatura mais recente considera que o gênero *Salmonella* consiste em duas espécies: *S. entérica* e *S. bongori*. A *S. entérica* é dividida em seis subespécies, que são distinguíveis por características bioquímicas. Estas subespécies são (OIE, 2004):

Tabela 1: Nomenclatura anterior e atual das subespécies que compõem a *Salmonella enterica*

Nomenclatura anterior	Nomenclatura atual
Subespécie I	Subespécie <i>enterica</i>
Subespécie II	Subespécie <i>salamae</i>
Subespécie IIIa	Subespécie <i>arizonae</i>
Subespécie IIIb	Subespécie <i>diarizonae</i>
Subespécie IV	Subespécie <i>houtenae</i>
Subespécie VI	Subespécie <i>indica</i>

Observação: na nomenclatura anterior, a subespécie V corresponde atualmente à *S. bongori*
Fonte: OIE, 2004

Em relação à grafia, considera-se internacionalmente aceito o esquema proposto pela CDC dos Estados Unidos, no qual o gênero, a espécie e a subespécie são escritos em letras itálicas e o sorovar em letras romanas; além disso, tem-se que a primeira letra deve ser escrita em maiúscula. Exemplificando, temos que a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar *typhimurium* pode ser escrita como *Salmonella Typhimurium* (CDC, 2002; OIE, 2004).

4.3.3. Epidemiologia

O principal reservatório das salmonelas é o trato intestinal dos animais e do homem, sendo a salmonelose uma das doenças mais frequentes tanto no homem como nos animais. A doença é transmitida para o homem através de carne, ovos, água e produtos de origem animal contaminados (PEREIRA E SILVA, 2005; KOTTWITZ et al., 2008). Alguns animais, principalmente aves e suínos, podem ser portadores assintomáticos e, com isso, contaminarem outros animais e produtos de origem animal. Este torna-se um dos principais fatores que dificultam a eliminação do agente do meio ambiente, fazendo com que a salmonelose mostre-se como uma das zoonoses mais problemáticas para a saúde pública em todo mundo (HOFER et al., 1997; OIE, 2004).

Para causar a doença no homem, a concentração de *Salmonella* spp. encontrada no alimento tem que ser superior à dose infectante, a qual dependerá de fatores ligados ao hospedeiro tais como espécie, idade, raça, condições nutricionais e imunológicas, assim como também a virulência do sorovar envolvido. Assim, tem-se que o simples fato da bactéria estar presente no alimento não é o suficiente para causar a doença, a qual somente será manifestada quando relacionada com as condições mencionadas inerentes ao hospedeiro. A dose infectante capaz de causar a doença, entretanto, é variável: pode ser de milhões de células, como por exemplo, 10^9 a 10^{10} para *S. Pullorum*, assim como pode ser de apenas uma célula, como ocorre com a *S. Typhi* (JAY, 2005; CFSAN, 2008).

Relatórios do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) mostraram que 8,8% dos surtos, 13,1% dos casos e 22,7% das mortes relacionadas à toxinfecções alimentares nos Estados Unidos, de 1998 a 2002, foram causados por *Salmonella* spp. (LYNCH et al., 2002). Segundo o CDC (2011), aproximadamente 40 mil casos de salmoneloses são reportados nos Estados Unidos a cada ano, sendo os sorovares mais comumente encontrados nas infecções humanas as *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. No Brasil, entre os anos de 1999 e 2009 houve

6.349 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), sendo que 49,7% (3.088) deles tiveram um agente definido e nos outros 51,3% não foi possível identificar a causa. Dos 3.088 casos onde o agente foi identificado, aproximadamente 47% foram causados por algum tipo de *Salmonella* spp, sendo ela o agente frequentemente identificado em surtos de toxinfecção alimentar (SVS, 2009). Esses números só não são maiores, pois no Brasil, assim como em outros países, muitos surtos não são notificados, uma vez que os sintomas são confundidos com uma simples gripe ou pelo fato da duração dos sintomas (náuseas, vômito, diarreia) serem de curta duração (EDUARDO et al., 2004; SVS, 2005).

A European Food Safety Authority (EFSA), órgão responsável pela segurança alimentar na União Europeia, reportou que no período entre 2001 e 2005 ocorreram 5.355 surtos de doenças de origem alimentar, dos quais 3.406 (63,6%) foram causados por *Salmonella* spp. (EFSA, 2005). Em 2009 ocorreram 108.614 surtos de salmoneloses, sendo que os principais sorovares encontrados foram *S. Enteritidis* e *S. Choleraesuis* (GREIG e RAVEL, 2009; EFSA, 2011).

4.3.4. Metodologias de detecção de salmonela

A metodologia convencional de detecção de *Salmonella* spp. estabelecida pela Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003) se baseia em características fenotípicas dos isolados, com uso de meios de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, e meios específicos para isolamento e seleção desse patógeno, seguidos de posterior confirmação com testes bioquímicos e reações de imunoaglutinação. Esse e outros métodos convencionalmente adotados em diferentes países consomem tempo, requerendo de 4 a 7 dias, e não sendo, portanto, adequados para o uso na rotina de monitoramento da linha de produção de alimentos (UYTTENDAELE et al., 2003; GERMINI et al., 2009). Além disso, as propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não estar sendo expressa e, mesmo quando expressas, podem ser difíceis de interpretar e classificar (MALORNY et al., 2003). A recuperação de patógenos pelos métodos convencionais também pode ser prejudicada devido à interferência da microbiota autóctone do alimento, comprometendo seu isolamento e identificação (BUSSE et al. 1995; de BOER, 1998; NERO et al., 2009).

Devido ao longo tempo de espera para se analisar os resultados para a detecção microbiológica convencional de salmonela, diversos métodos alternativos vêm sendo desenvolvidos, dentre eles as técnicas moleculares. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é a técnica molecular que mais vem sendo estudada para detecção de salmonela, visto tratar-se

de uma técnica mais rápida, possuir maior especificidade, maior sensibilidade e menor limite de detecção (MALORNY et al, 2003; UYTENDAELE et al, 2003; GERMINI et al, 2009).

4.3.4.1. Microbiologia Convencional

O pré-enriquecimento é o primeiro passo para identificação de *Salmonella* spp após a coleta das amostras, adicionando-se 225 ml do diluente específico (solução salina peptonada 1% tamponada para alimentos, rações e ingredientes, ou quando for leite em pó e/ou soro de leite em pó utilizar como diluente água destilada e adicionar 5 ml de verde brilhante solução aquosa 0,1%) em 25 gramas (ou 25 ml) da amostra e incubando a solução formada a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por, pelo menos, 16 horas e não mais que 20 horas. Essa etapa visa diminuir os efeitos do processamento industrial dos alimentos, causando um “estresse” nas células de *Salmonella* spp, sem inativá-las biologicamente, além de impedir que outras bactérias acidifiquem o meio (BRASIL, 2003).

A fase de enriquecimento se dá a partir do pré-enriquecimento, inoculando-se, simultaneamente, 0,1 ml da primeira solução em um tubo contendo 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis (RV); 1 ml da mesma primeira solução em um tubo contendo 10 ml de caldo Selenito Cistina (SC); e, se preferir, adicionar também 1 ml em um tubo contendo 10 ml de caldo Tetracionato (TT). Todos os tubos devem ser incubados em banho-maria a $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 a 30 horas. O RV possui em sua composição peptona de farinha de soja, o que estimula o crescimento da *Salmonella* spp, além de conter verde malaquita e cloreto de magnésio, tornando-o um caldo seletivo. No caldo SC, o agente inibidor selenito de sódio atua inibindo os coliformes e enterococos (BRASIL, 2003).

Após a fase de enriquecimento, segue-se a etapa de isolamento e seleção da *Salmonella* spp, desde que os tubos com os caldos de enriquecimento apresentem sinais de crescimento (turvação do caldo). Ocorrendo a turvação, repica-se inóculo do conteúdo dos caldos sobre a superfície de placas contendo meios de cultura sólidos, sendo o agar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BPLS) de uso obrigatório, e o segundo meio de cultura ficando à escolha (os de preferência são: agar Rambach ou MLCB ou XLD). Posteriormente, ou seja, após devidamente estriadas, as placas deverão ser incubadas, invertidas, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas (BRASIL, 2003).

Na composição do BPLS há a presença de bile bovina e de um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante), substâncias estas responsáveis pela inibição de bactérias gram positivas. O meio possui ainda a adição de novabiocina (antibiótico), responsável por inibir o crescimento de *Proteus* sp.

No MLCB, a concentração de íons de magnésio proporciona o crescimento da *Salmonella* spp e a presença de verde brilhante inibe a flora bacteriana acompanhante; é evidenciada também a produção de H₂S (teste bioquímico utilizado para identificação de *Salmonella*) através do enegrecimento do centro da colônia (BRASIL, 2003). É um meio que, associado ao caldo de enriquecimento Rappaport Vassiliadis, tem sua seletividade substancialmente aumentada.

Na seleção, selecionar de 3 a 10 colônias típicas por amostra, conforme características descritas na tabela 2 (BRASIL, 2003):

Tabela 2: Característica das colônias de *Salmonella* em cada um dos agares que podem ser utilizados para sua identificação de acordo com a Instrução Normativa nº 62.

Meio de cultura sólido	Característica da colônia
Agar BPLS	Incolores ou de cor rosada, entre translúcidas e ligeiramente opacas. Cor verde-amarelada quando rodeadas por microrganismos fermentadores de lactose.
Agar MLCB	Colônias negras, convexas lisas e brilhantes, com bordas regulares. <i>Salmonella Pullorum</i> e <i>Salmonella Gallinarum</i> apresentam-se de cor azul intensa ou violeta. Não há crescimento de <i>Salmonella Typhi</i> e <i>Salmonella Paratyphi</i>
Agar XLD	Colônias vermelhas ou pretas (quando produtoras de H ₂ S);
Agar Rambach	Colônias de cor vermelha. Alguns sorovares apresentam-se com coloração rosa claro, pêssego ou amarelo.

FONTE: adaptação do texto BRASIL, 2003

Após a seleção, realizar algumas provas bioquímicas, tais como: verificação da presença de citocromo oxidase (negativa); produção de urease (negativo); fermentação da glicose (positivo), sacarose (negativo) e lactose (negativo) no meio TSI; descarboxilação da lisina (maioria negativo); produção de H₂S (maioria positivo); motilidade (a maioria apresenta motilidade positiva, a *Salmonella Gallinarum* e a *Salmonella Pullorum* apresentam motilidade negativa) e produção de indol (negativo, apenas 1% produz) (BRASIL, 2003).

A última etapa é a prova de soroaglutinação, que baseia-se na reação antígeno-anticorpo, com consequente aglutinação do antígeno frente ao anti-soros para *Salmonella* spp polivalente “O” e “H”, dois fatores de virulência da bactéria. As culturas que apresentarem perfil bioquímico compatível com *Salmonella* spp e que não reagirem frente aos anti-soros polivalente “O” e “H” ou apresentarem reação inespecífica devem ser identificadas por método molecular ou remetidas para uma Instituição de Referência, para conclusão do resultado (BRASIL, 2003).

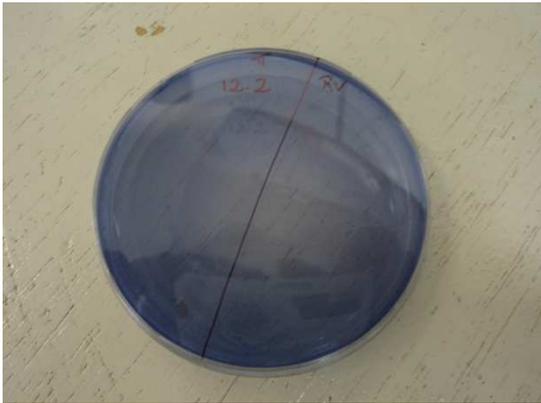


FIGURA 10: Placa de petri contendo meio de cultura MLCB.

FONTE: Arquivos pessoais, 2011

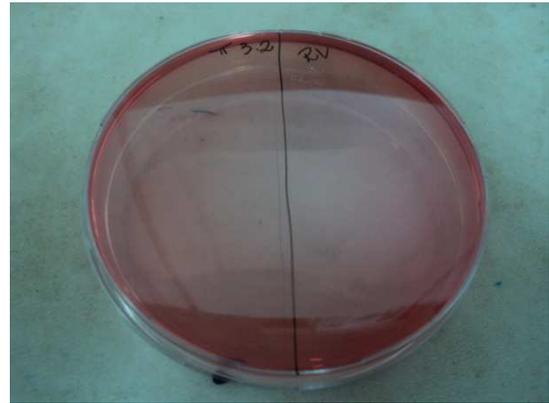


FIGURA 11: Placa de petri contendo meio de cultura XLD.

FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 12: Placa de petri com meio de cultura Rambach. De vermelho, colônias típicas de *Salmonella* que crescem no agar.

FONTE: Arquivos pessoais, 2011

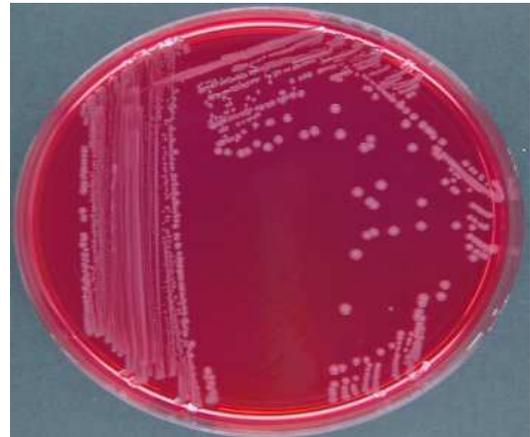
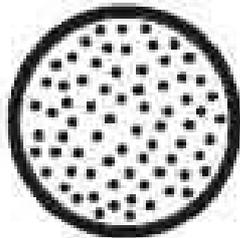


FIGURA 13: Crescimento de *Salmonella* em meio de Cultura BPLS. As colônias são avermelhadas, pois a *Salmonella* não fermenta lactose e sacarose.

FONTE: Arquivos pessoais, 2011

POSITIVO
HÁ AGLUTINAÇÃO



NEGATIVO
NÃO HÁ AGLUTINAÇÃO

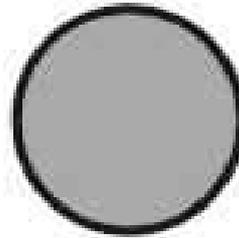


FIGURA 14: prova de soroaglutinação, que baseia-se na reação antígeno-anticorpo, com conseqüente aglutinação do antígeno frente aos anti-soros para *Salmonella* polivalente “O” e “H”.

FONTE: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/salmonelose/salmonelose-4.php>

4.3.4.2. PCR

A reação de polimerização em cadeia (“Polimerase chain reaction”, PCR) é a técnica que permite a amplificação do DNA *in vitro*. O DNA é uma dupla hélice, formado por desoxiribonucleotídeos, os quais são formados por 4 tipos de bases: adenina e guanina (púricas) e citosina e timina (pirimídicas). Essas bases estão voltadas para o interior da cadeia e interagem entre si ordenadamente e por meio de pontes de hidrogênio, estabilizando deste modo a dupla hélice. As ligações covalentes aminoglicosídicas, entre o grupamento fosfato α ligado ao C5 de um nucleotídeo com a hidroxila do C2 de outro nucleotídeo, unem os nucleotídeos e formam a cadeia (SAIKI, et al., 1988).

Dentro da célula, durante o processo de replicação, diversas proteínas se ligam a regiões determinadas (origens de replicação), promovendo a abertura das fitas, e introduzindo os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para que a enzima DNA polimerase promova o alongamento da cadeia de forma bidirecional sempre no sentido 5’-3’, a partir de uma fita molde, formando 2 fitas idênticas a original. Esse processo é mimetizado pela reação de PCR.

Primeiramente é necessário extrair o DNA da célula para que este possa ser alcançado pela enzima polimerase. Depois é necessário abrir as fitas do DNA, o que é conseguido através do aumento da temperatura que proporciona o aumento da energia cinética das moléculas, levando ao rompimento das pontes de hidrogênio que ligam as fitas. Essa reação é reversível, visto que as fitas se unem novamente quando a temperatura é abaixada. Com as fitas separadas, os *primers* específicos de cada reação (desenhados para anelar em locais determinados do genoma, amplificando apenas o gene alvo) podem anelar na seqüência complementar do DNA se esta estiver presente. A enzima polimerase utilizada *in vitro* é derivada de microrganismos termófilos e resiste às altas temperaturas usadas para desnaturar as fitas. Após o anelamento dos *primers* a enzima atua adicionando os oligonucleotídeos um a um. Durante a PCR são realizados vários ciclos para que o fragmento alvo seja amplificado milhões de vezes. Geralmente são usados de 20-35 ciclos, os quais englobam as etapas de abertura das fitas, anelamento e extensão dos *primers*. Como a quantidade do fragmento de DNA amplificado é muito grande, depois de realizada a eletroforese é possível visualizar uma banda de DNA no gel de agarose (MULLIS e FALOONA, 1987).

Após cada ciclo, o número de fragmentos se duplica: de um formando-se 2, e então novamente 4, 8, 16, 32, 64, 128... de tal forma que pode ser definida matematicamente por:

$$N = N_0 \times 2^n$$

N = número de moléculas amplificadas
 N_0 = número de moléculas iniciais
 n = número de ciclos de amplificação

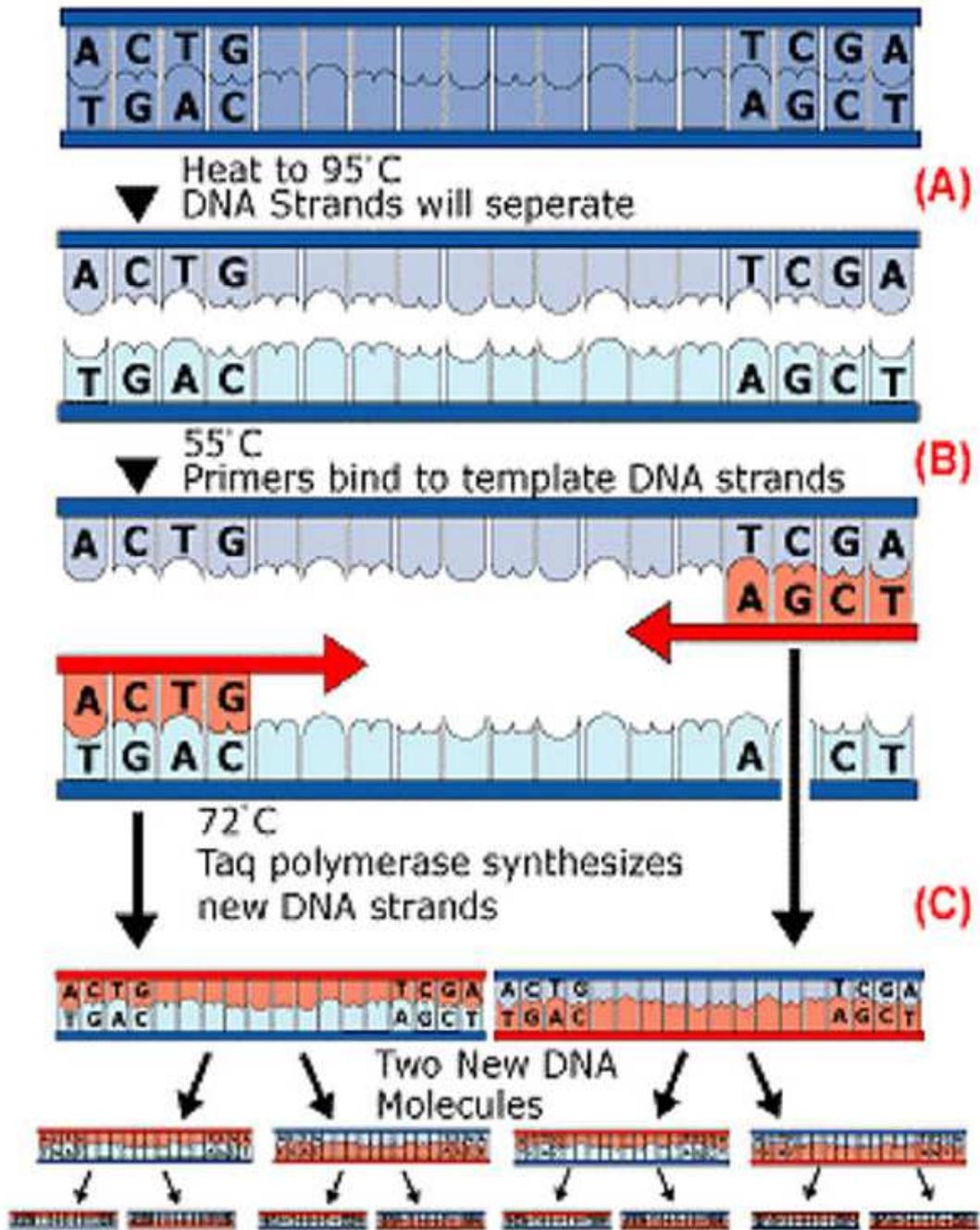


FIGURA 15: Esquema de PCR com as 3 fases (desnaturação, anelamento e extensão).
FONTE: http://www.encyclopedia.com.pt/print.php?type=A&item_id=1038

Na aplicação diagnóstica e, particularmente na Microbiologia, a atuação da biologia molecular é muito ampla, apesar de estar ainda no cunho de afirmação e de uso restrito à pesquisa e ao ensino. Porém, muitas doenças infecciosas dependem de um diagnóstico rápido e seguro. A sua liberação para uso rotineiro no laboratório clínico ainda não é permitida para toda as possíveis aplicações, porém tem-se que a necessidade da utilização de meios mais sensíveis e precisos farão com que a técnica de PCR se torne uma ferramenta imprescindível e quase obrigatória no diagnóstico precoce de várias doenças, apesar do custo ainda mostrar-se um pouco elevado (EHLN e DUBEAU, 1989).

Os principais problemas citados na literatura para a padronização da técnica de PCR são: não detecção do produto, baixo rendimento do produto desejado, presença de bandas não específicas, formação de dímeros dos “*primers*” que competem pela amplificação com o produto desejado e mutação devido a erro de incorporação (KANKI, et al, 2009).

5. Acompanhamento no Estágio

5.1. Introdução ao projeto de mestrado

O projeto intitulado “Avaliação das técnicas de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) e *Nested-PCR* na identificação de *Salmonella* spp. em carcaças bovinas” tem como finalidade avaliar métodos alternativos na detecção de *Salmonella* spp, uma vez que os métodos convencionais são demorados e trabalhosos.

Foram utilizadas cepas de *Salmonella* spp., como controle positivo e cepas não-*Salmonella*, sendo elas escolhidas pelo fato de serem relacionadas a *Salmonella* ou por serem encontradas no mesmo ambiente e crescerem sob as mesmas condições, tais como, *Enterobacter cloacae*, *Raoutella planticola*, *Serratia marcescens*, *Hafnia alvei*, *Proteus mirabillis*, *Providencia rettgeri*, *Edwardisiella tarda*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria inócua* e *Staphylococcus aureus*.

As amostras foram adquiridas do projeto “Implantação de um centro colaborador em defesa agropecuária para avaliação de riscos microbiológicos em produtos de origem animal (CDA-ARMPOA)”, onde era feito swabs de carcaça bovina em abatedouros selecionados em Minas Gerais e estes acondicionados em bolsas estéreis contendo água peptonada 0,1%, e homogeneizados por 5 minutos em homogeneizador peristáltico tipo *Stomacher*.

O método microbiológico convencional utilizado foi o da ISO 6579:2001 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2002). Uma alíquota de 40 mL do homogenato inicial foi centrifugada e o sedimento ressuspensionado em água

peptonada tamponada (APT), que era incubada a 37°C por 18h. Em seguida, 0,1 mL da APT era transferido para um tubo contendo 10 mL de caldo RV (Figura 16) e incubado a 41,5°C por 24h em banho-maria. Outra porção de 1 mL era transferida para um tubo contendo 10 mL de caldo tetrionato Muller-Kauffmann com novobiocina (MKTTn) (Figura 17) e incubado a 37°C por 24h. Após incubação, um inóculo de cada caldo era estriado em placas com ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (Figura 18 e 19) e ágar Mannitol Lysine Crystal Violet Brilliant Green (MLCB) (Figura 20), com incubação a 37°C por 24h. Duas a quatro colônias típicas de *Salmonella* spp. eram submetidas a provas bioquímicas, empregando-se ágar tríplice açúcar ferro (TSI) (Figura 21) e Lysine Iron Agar (LIA) (Figura 22).

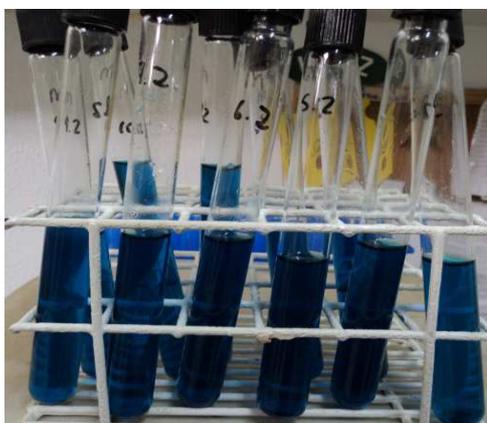


FIGURA 16: Fase de enriquecimento para *Salmonella*. Caldo Rappaport-Vassiliadis.

FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 17: Fase de enriquecimento para *Salmonella*. Caldo Tetrionato.

FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 18: Agar XLD com colônias pretas, típicas de *Salmonella*.

FONTE: Arquivos pessoais, 2011

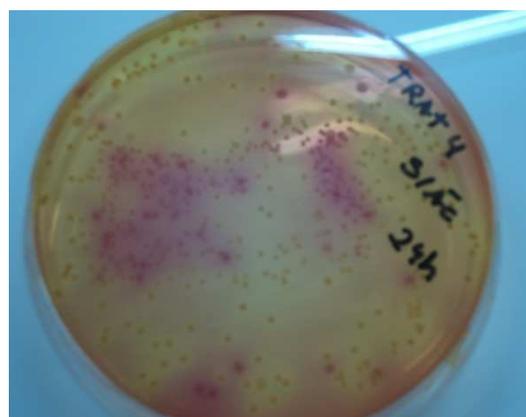


FIGURA 19: Agar XLD com crescimento de colônias, porém negativo para *Salmonella*.

FONTE: Arquivos pessoais, 2011



Figura 20: Crescimento de colônias típicas de *Salmonella* em agar MLCB.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 21: Agar TSI com resultado positivo para *Salmonella*.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 22: Agar LIA com resultado positivo para *Salmonella*.
FONTE: LACOMA (Palotina)

As alíquotas submetidas ao PCR foram coletadas nas seguintes etapas: homogenato inicial (água peptonada 0,1%), caldo de pré-enriquecimento (APT 1%) e caldos de enriquecimento seletivo RV e MKTTn, após suas respectivas incubações, quando pertinente. Esses isolados foram recuperados em caldo Brain Heart Infusion (BHI), com incubação a 37°C por 24h. O DNA era extraído utilizando-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, EUA). Após extração, o DNA era submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e observado em transluminador. O DNA extraído era então estocado à -20°C, até utilização na PCR (Figura 23).

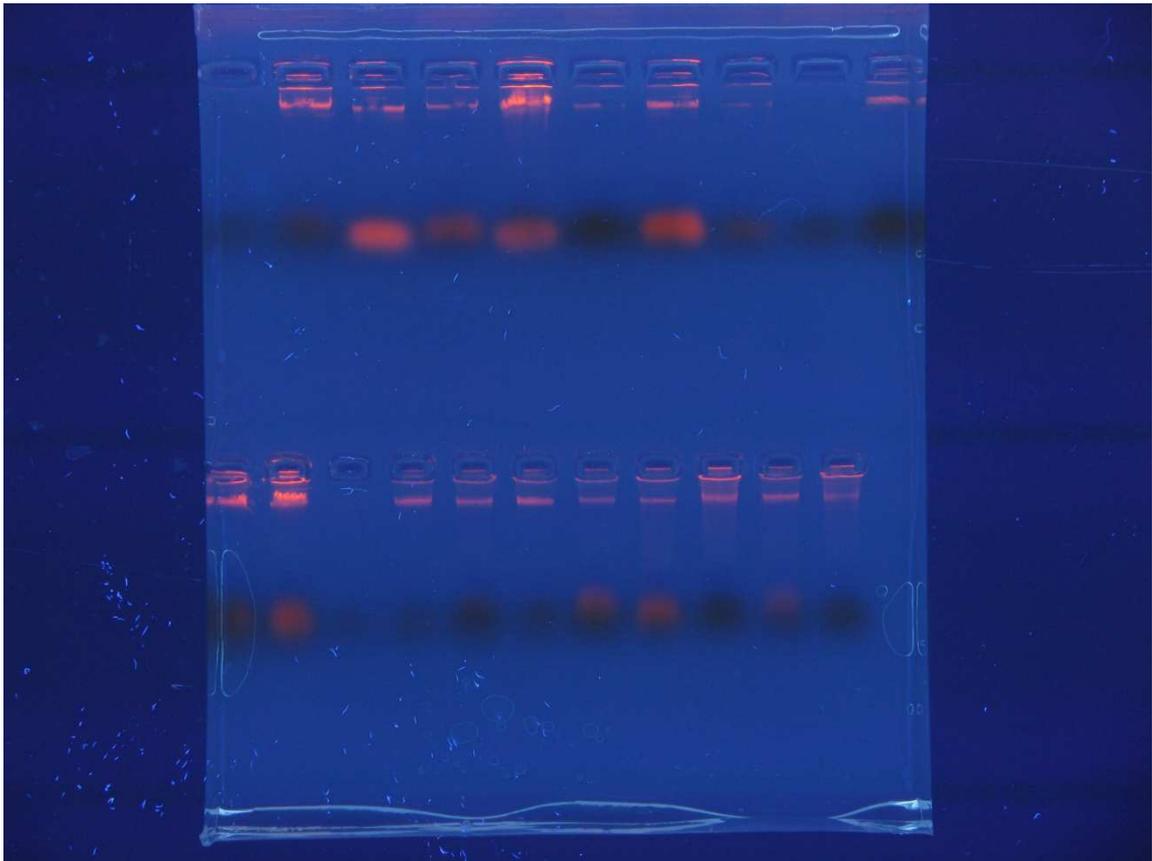


FIGURA 23: Visualização da extração de DNA em transluminador submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, sendo que a mínima presença de DNA indica uma realização correta da extração.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

5.1.1. Realização do PCR

Após a extração do DNA, foi realizado o PCR com cada amostra, sendo que cada uma dela era submetida aos 5 *primers* selecionados.

A preparação da amostra era em uma capela de fluxo contínuo, utilizando um Kit que já continha a Taq polimerase, Cl_2Mg , dNTP (desoxirribonucleotídeos) e outros componentes necessários para o PCR. Esse Kit era misturado junto com os *primers* selecionados (forward e reverse) e, posteriormente, as amostras de DNA obtidas da extração eram então adicionadas (a adição do DNA era feita fora da capela para que não houvesse contaminação do KIT e dos *primers*).

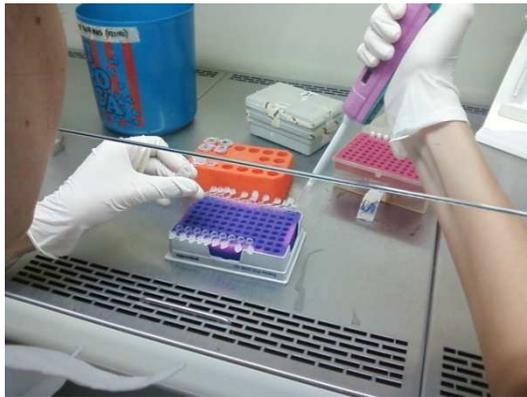


FIGURA 24: preparação do Mix (Kit para PCR e os primers) dentro da capela de fluxo contínuo.
 FONTE: arquivos pessoais, 2011



FIGURA 25: Adição do DNA obtido da extração dentro do eppendorf contendo o Kit para a PCR e o primer em questão.
 FONTE: Arquivos pessoais, 2011

Após isso, os *ependorfs* eram postos em um termociclador (aparelho utilizado para realização das etapas do PCR) (Figura 26), onde cada *primer* já possuía seu programa gravado, com temperatura e número de ciclos específicos para cada um deles (Figura 27). Saindo do termociclador, as amostras eram colocadas em gel de agarose 1% e submetidas à eletroforese (Figuras 28 e 29). No gel, além das amostras, era colocado um controle positivo (uma cultura de ATCC de *Salmonella*) e um controle negativo (água pura). Em seguida, o gel era posto no transluminador (Figura 30) para verificar se as amostras eram positivas para o *primer* em questão.



FIGURA 26: Termociclador.
 FONTE: arquivos pessoais, 2011



FIGURA 27: Visor do Termociclador, contendo as etapas do PCR com o número de ciclos e a temperatura de cada uma delas.
 FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 28: Aparelho de eletroforese e a cuba para suporte do gel de agarose.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 30: Transluminador utilizado para visualização do gel com as reações logo após a saída da eletroforese.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

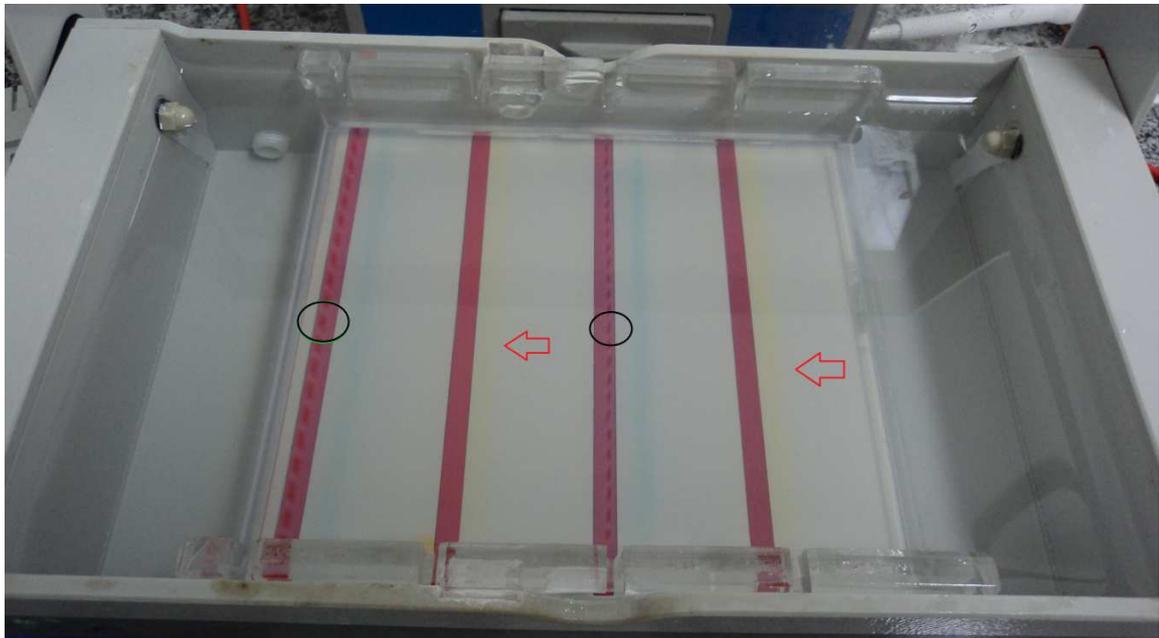


FIGURA 29: Cubo de suporte para o gel de agarose. Os círculos pretos indicam as canaletas onde eram postos as reações de PCR. As setas vermelhas indicam o quanto a reação já "correu" no gel.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

Depois de visualizado no transluminador, o gel era levado até outro aparelho semelhante, porém com uma máquina fotográfica, e este era acoplado à um notebook para que o gel com as reações de PCR fossem fotografados e armazenados (Figura 31). No notebook, as bandas de DNA eram comparadas ao controle positivo: quando elas se encontravam na mesma altura, a amostra era positiva para o *primer* em questão e caso não houvesse o aparecimento de nenhuma banda ou ainda houvesse uma banda inespecífica, essa era considerada negativa (Figura 32, 33 e 34)

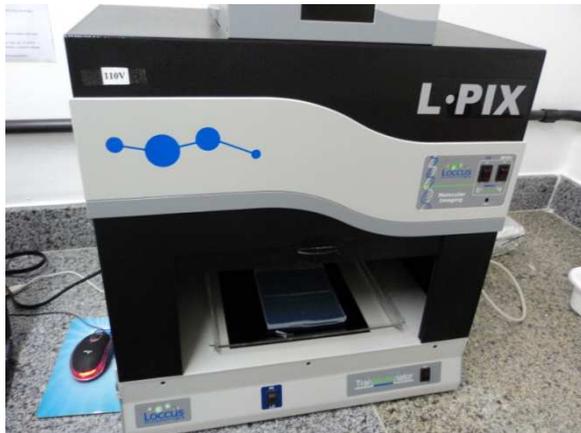


FIGURA 31: Transluminador com máquina fotográfica acoplado à um notebook.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

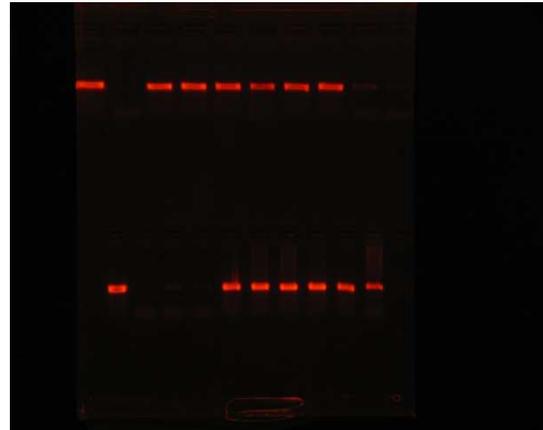


FIGURA 32: Resultado do PCR. A primeira canaleta do gel é o controle positivo e a segunda o negativo (água).
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

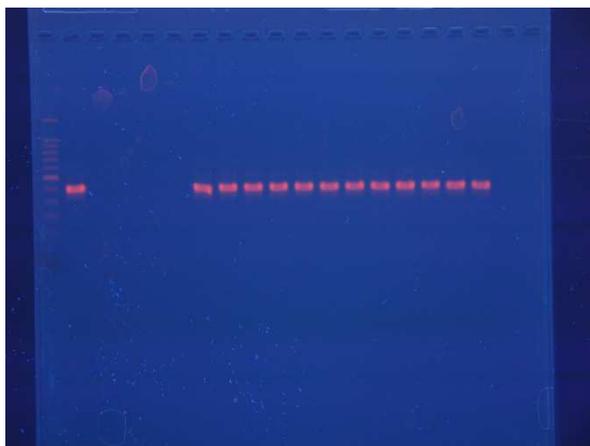


FIGURA 33: Resultado do PCR. A primeira canaleta contém um marcador onde cada banda representa uma quantidade específica de pares de base.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

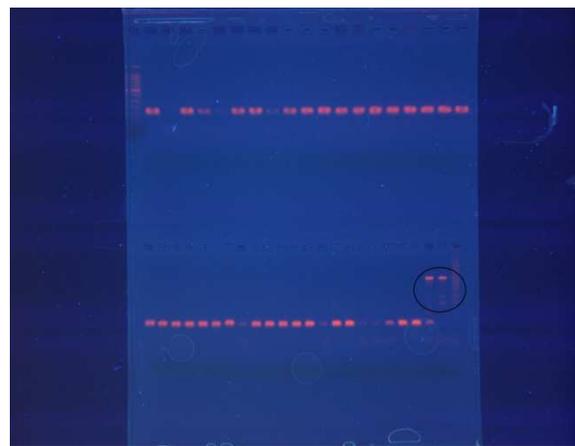


FIGURA 34: Resultado do PCR. O círculo preto mostra o aparecimento de bandas inespecíficas em 3 amostras.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

A altura da banda no gel de agarose se dá pelo peso molecular que, por sua vez, é definido pelo número de pares de base que o *primer* possui, ou seja, uma molécula inteira de DNA quando feita a eletroforese não vai ter “corrido” o gel na mesma proporção que uma amostra onde se encontra apenas um segmento do DNA (no caso quando se utiliza o *primer*). Cada *primer* possui uma quantidade de pares de base específica, assim, *primers* com quantidades menores de pares de bases tendem a “correr” mais o gel.

Por se tratar de um projeto de mestrado ainda em andamento, não foi possível ilustrar resultados específicos dizendo se o PCR foi eficiente na detecção de *Salmonella* spp em homogenato, pré-enriquecimento e/ou enriquecimento, Após realizar o PCR em todas as

amostras, ainda será feito o *nexted*-PCR, que é um método de análise derivado do PCR, porém mais específico, uma vez que o segmento se encontra dentro do segmento analisado no PCR. Contudo, como não foi acompanhada nenhuma análise do procedimento em questão, não foi relatado no presente relatório.

5.2. Conclusão

A *Salmonella* spp é um microrganismo de grande importância para saúde pública, sendo ela a responsável pela principal doença que acomete tanto o homem como os animais (salmonelose), uma vez que é de difícil seu controle, visto que existem muitos animais que são portadores assintomáticos.

Os métodos convencionais de detecção da *Salmonella*, tanto os propostos pela Legislação Brasileira como os seguidos pela ISO, CDC ou órgãos de outros países, são demorados (levam de 4 a 7 dias), além de não serem adequados para o uso na rotina de monitoramento da linha de produção de alimentos. Outro ponto negativo desses métodos é que as propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não estar sendo expressas, e mesmo quando expressas, podem ser difíceis de interpretar e classificar.

O PCR é uma técnica que pode suprir essas falhas dos métodos convencionais, pois é uma técnica com maior especificidade, além de ter a capacidade de fornecer um resultado em menor tempo, ou seja, uma vez estabelecido um padrão e uma técnica que proporcione um resultado confiável, o alimento pode chegar ao consumidor livre do patógeno.

6. LEITE DE CABRA

6.1. Revisão Bibliográfica

6.1.1. Introdução

Por sua composição, o leite é considerado um dos alimentos mais completos em termos nutricionais sendo fundamental para dieta humana. Entretanto, pela mesma razão, constitui num excelente substrato para o desenvolvimento de uma grande diversidade de microrganismos, inclusive os patogênicos provenientes do próprio animal, do homem e dos utensílios utilizados na ordenha. Daí a constante preocupação com a qualidade do leite para técnicos e autoridades ligadas à área de saúde, principalmente pelo risco de veiculação de microrganismos relacionados com surtos de doenças de origem alimentar (LEITE JR et al., 2000; TIMM et al., 2003). Portanto, o leite deve ser manuseado de forma correta desde a ordenha até chegar à indústria e ao consumidor final (ANUÁRIO MILKBIZZ, 1996).

A higiene e o controle do leite e produtos lácteos têm como objetivo básico assegurar a sua inocuidade ao consumidor. A contaminação com certos microrganismos e/ou suas toxinas, constituem as causas mais freqüentes de problemas sanitários, além das perdas econômicas (PADILHA et al., 2001). Esta prática reduz os custos operacionais de produção, incluindo a deterioração do leite por atividade acidificante de bactérias mesofílicas. Porém, pode ocasionar problemas tecnológicos associados à atividade de enzimas proteolíticas e lipolíticas de bactérias psicrotólicas (PINTO et al., 2006).

6.1.2. A caprinocultura leiteira

A caprinocultura é uma das atividades mais antigas da civilização humana, contribuindo para a fixação do homem em primeiros núcleos de assentamento, fornecendo produtos importantes como o leite, a carne e a pele. No Brasil, os primeiros colonos portugueses trouxeram os caprinos no início da colonização, deixando para o país uma importante fonte de suprimento alimentar, principalmente para regiões mais áridas (CORDEIRO, 2006).

O leite de cabra tem um papel importante na alimentação do ser humano, principalmente por sua qualidade nutricional a qual possui características dietéticas e terapêuticas fundamentais (FISBERG et al., 1999). O leite caprino possui alcalinidade distinta, maior efeito e alta digestibilidade tamponante justificada pelo elevado teor de ácidos graxos de cadeia curta e média, o que favorece o esvaziamento gástrico e, em consequência, reduz o aparecimento de refluxo gastro-esofágico (HAENLEIN, 2004). Além disso, é um leite bastante utilizado como alternativa para alimentação de crianças e adultos sensíveis ou

alérgicos ao leite de vaca. Isto se deve as diferenças existentes entre a estrutura dos aminoácidos das proteínas do leite das duas espécies (CLARK, 2005).

A produção de leite caprino e seus derivados destina-se a um nicho de mercado restrito, uma vez que a produção de leite bovino possui uma grande produção, menor custo de produção e menor preço de mercado, (HAENLEIN, 2004). A maior parte do consumo do leite caprino se dá sob condições de leite fluído (94%), seguido de leite em pó (3%) e derivados, como queijos e iogurtes (3%) (BORGES, 2003).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 2011), em 2009 o rebanho caprino era de 868.000.000 de cabeças, com uma produção de leite aproximada de 15 milhões de toneladas por ano/mundo. Já no Brasil, o rebanho caprino em 2006 foi de 9.850.000 cabeças, com uma produção de leite caprino de aproximadamente 150.000 toneladas por ano (Tabelas 3 e 4). Aqui, a caprinocultura é bastante desenvolvida na região Nordeste, que possui 92 % do rebanho nacional de caprinos (IBGE, 2011), e é caracterizada como uma atividade de base familiar e que vem se desenvolvendo rapidamente, decorrente do leite caprino constituir uma importante fonte de alimento para famílias de baixo poder aquisitivo e pela alta capacidade produtiva dos animais (leite, carne e couro) em locais com condições desfavoráveis para exploração agrícola e pecuária. Porém, a qualidade e quantidade do leite produzido ainda precisam ser melhoradas (CORREIA et al., 2001).

Tabela 3: Efetivo e Ranque dos maiores rebanhos caprinos no mundo

CAPRINOS		
País	Cabeças	Part. (%)
1º China	172.957.208	23,3
2º Índia	124.500.000	16,8
3º Paquistão	52.800.000	7,1
4º Sudão	40.000.000	5,4
5º Bangladesh	34.500.000	4,6
6º Nigéria	27.000.000	3,6
7º Irã	26.000.000	3,5
8º Indonésia	12.450.000	1,7
9º Tansânia	11.700.000	1,6
10º Quênia	11.000.000	1,5
11º Brasil	9.850.000	1,3

Total Mundial	742.864.558	100
----------------------	--------------------	------------

FONTE: FAO, 2006

Tabela 4: Produção mundial de leite de cabra

País	Tonelada
Índia	3.200.000
Bangladesh	1.280.000
Paquistão	1.197.000
Sudão	560.000
França	495.000
Iran	396.000
Somália	360.000
Espanha	317.000
Turquia	233.000
China	232.912
Indonésia	232.000
Grécia	229.600
Mali	175.000
Ucrânia	148.000
Brasil	141.000
Mundo	12.048.894

FONTE: FAO, 2002

Um procedimento importante para adequação da produção leiteira no Brasil, inclusive em relação ao leite de cabra, foi à adoção da cadeia do frio entre a produção e a indústria (BRASIL, 2002; SANTOS e FONSECA, 2003). A conservação do leite cru sob refrigeração é importante para inibir o desenvolvimento microbiano e conseqüente deterioração de seus componentes. Em relação ao leite de cabra produzido no Brasil, usualmente é adotada a refrigeração já nas propriedades rurais, com transporte do leite cru também sob refrigeração, e até mesmo congelado (BRASIL, 2000).

6.1.3. Instrução Normativa nº 37/2000

Esta instrução normativa tem como objetivo fixar as condições de produção, a identidade e os requisitos mínimos de qualidade do leite de cabra destinado ao consumo humano, referente ao seu comércio nacional. De acordo com ela, o leite de cabra é definido

como “o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais da espécie caprina sadios, bem alimentados e descansados” (BRASIL, 2000, p. 1).

Até 1988, não existia no Brasil uma regulamentação específica sobre produção e comercialização de leite de cabra e, com isso, não havia um controle adequado da sanidade do rebanho, da higiene de produção e nem da qualidade dos produtos (CORDEIRO et al., 2006). Com a publicação da Instrução Normativa nº37 (BRASIL, 2000), a produção e o beneficiamento do leite caprino foram regulamentados no Brasil; porém, essa legislação só estabelece os critérios microbianos para o produto pasteurizado e esterilizado e não para o leite cru. A tabela 5 mostra os critérios microbiológicos e sua tolerância quanto ao leite de cabra pasteurizado e esterilizado:

Tabela 5: Critérios microbiológicos e tolerância impostos pela Instrução Normativa Nº 37 ao leite de cabra pasteurizado e esterilizado

Requisito	Critérios de Aceitação	Categoria (ICMSF)	Método de Análise
Microrganismos Aeróbios mesófilos (UFC/mL):	1 - n= 5; c= 2; m= 1 x 10 ⁴	1 = 5	Portaria S.D.A/MA 101, de 11/8/93
1- Pasteurizado	M= 5 x 10 ⁴	2 = 10	
2- Esteriliz./UHT	2 - n= 5; c=0; m= 10		
Coliformes/mL (30/35°C)	1 - n= 5; c= 2; m= 2;	1 = 5	idem item anterior
1- L. Pasteuriz.	M= 4	2 = 5	
2- L. Esteriliz./UHT	2 - n= 5; c= 0; m= 0		
Coliformes/mL (45°C)	1 - n= 5; c= 2; m= 0 ;	1 = 5	idem item anterior
1-L. Pasteuriz.	M= 1	2 = 5	
2-L. Esteriliz./UHT	2 - n= 5; c= 0; m= 0		
<i>Salmonella spp./ 25 MI (L.Past./Esteriliz./UHT)</i>	N= 5; c= 0; m= 0	1 = 5	idem item anterior
		2 = 5	

FONTE: Instrução Normativa Nº 37 (BRASIL, 2000)

Na Europa e nos Estados Unidos, o método de regular e prevenir zoonoses e outras bactérias patogênicas ou suas toxinas em leite de cabra é realizado através da contagem bacteriana no leite de cabra cru. A contagem bacteriana é definida pelo número de microrganismos aeróbios por unidade formadora de colônia (UFC) (PIRISI et al., 2007).

6.1.4. Principais microrganismos do leite cru

De acordo com a faixa de temperatura ótima para multiplicação, os microrganismos associados a alimentos podem ser classificados em 3 categorias: (1) bactérias psicrófilas (multiplicação entre 0 e 15°C), (2) bactérias mesófilas (entre 20 e 40°C) e (3) bactérias termófilas (entre 44 e 55°C). Existem também duas outras categorias de microrganismos que devem ser consideradas: os psicrotróficos, caracterizados por microrganismos que conseguem se desenvolver em baixas temperaturas (menores que 7°C), independentemente de sua temperatura ótima de multiplicação, e os termodúricos, que compreendem os microrganismos capazes de resistir ao processo térmico de pasteurização (FONSECA e SANTOS, 2000). Esses grupos de microrganismos estão relacionados com a qualidade microbiológica dos alimentos, principalmente o leite, sendo importantes indicadores das condições higiênicas de produção, além de constituírem importantes indicadores de problemas durante a obtenção e processamento destes (CARVALHO, 2001). Neste sentido, vários outros grupos de microrganismos podem ser pesquisados em leite, visando à identificação de problemas pontuais na cadeia produtiva, tais como as enterobactérias e os coliformes.

O gênero *Escherichia* sp, juntamente com os gêneros *Enterobacter* sp, *Citrobacter* sp e *Klebsiella* sp, formam o grupo denominado coliformes. Esses são bastonetes curtos, Gram negativos, não formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos e fermentadores de lactose com produção de gás. Os coliformes podem ser classificados em dois grupos: coliformes totais e coliformes fecais, também chamados de termotolerantes (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 1997; FDA, 2002).

Os coliformes totais são representados por cerca de 20 espécies de bactérias, dentre as quais se encontram bactérias originárias do meio ambiente e do trato intestinal de humanos e de outros animais de sangue quente (GEUS e LIMA, 2008). Já os coliformes termotolerantes têm como principal representante a *Escherichia coli*, identificada em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich. Em 1892, Shardingner propôs a utilização da *E. coli* como indicador de contaminação fecal devido sua ampla distribuição no intestino de humanos e animais. Embora a maioria das cepas não sejam consideradas patogênicas, muitas são patógenos oportunistas que causam infecção intestinal em humanos (FDA, 2002; GEUS e LIMA, 2008).

Os coliformes, portanto, constituem um grupo associado à contaminação de água e ambiente de ordenha, sendo um importante indicador de condições higiênicas específicas na produção de leite. Além disso, altas contagens desses microrganismos no alimento podem indicar tratamento térmico e manipulação inadequados, além de falta de sanitização dos

equipamentos (SORHAUG e STEPANIAK, 1997). Várias espécies de coliformes são psicrotróficos, podendo estar presentes em leite cru de maneira significativa (SANTOS e LARANJA, 2001).

A multiplicação microbiana do leite pode ser diminuída pela refrigeração logo após a ordenha, desde que esteja associada a outros fatores, especialmente de ordem higiênica. Neste processo de conservação do leite pelo frio, recomenda-se que, na segunda hora após a ordenha, o mesmo deve estar a 4°C, condição que não impede o desenvolvimento de psicrotróficos. Na grande maioria das propriedades leiteiras, a temperatura de refrigeração oscila de 5 a 10°C, o que pode ser considerado um “resfriamento marginal do leite” (SANTOS e LARANJA, 2001). Nesta faixa de temperatura ocorre a multiplicação de microrganismos psicrotróficos, como os pertencentes os gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacte* e *Flavobacterium*, (SORHAUG e STETANIAK, 1997). Tem-se que *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Serratia spp.*, *Listeria spp.*, *Yersinia spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Micrococcus spp.* e *Clostridium spp.* são exemplos de importantes microrganismos psicrotróficos associados ao leite (FONSECA e SANTOS, 2000).

Segundo Wiedmann et al. (2000), a deterioração do leite se dá principalmente pelos psicrotróficos devido ao fato deles produzirem a maioria das enzimas proteolíticas e lipolíticas que são secretadas durante a estocagem e antes do processamento do alimento. Muitas dessas enzimas podem resistir ao processamento de pasteurização rápida, conduzido a 72°C por 15 segundos e, até mesmo ao processo de ultra-alta temperatura (UHT), que utiliza temperatura entre 138°C e 149°C por 2 a 10 segundos. A atividade dessas enzimas pode reduzir a qualidade sensorial e a vida de prateleira dos produtos lácteos fluidos processados. Desta forma, tem-se que uma ampla variedade de problemas relacionados à qualidade de produtos lácteos pode estar associada à ação das lipases e proteases de origem microbiana, como alteração do sabor e odor do leite (FONSECA e SANTOS, 2000).

Dentre os vários tipos de microrganismos que podem estar envolvidos com a contaminação do leite pós-pasteurização, destaca-se a *Pseudomonas spp.*, bactérias responsáveis por causar a deterioração do leite pasteurizado durante a estocagem sob refrigeração (PINTO, 2006). Essa contaminação ocorre principalmente durante o envase do leite pasteurizado, que pode não ser conduzido de forma asséptica (ENEROTH et al., 2000; WIEDMANN et al., 2000). De acordo com Sorhaug e Stepaniak (1997), a multiplicação da microbiota psicrotrófica contaminante, produtora de proteases termoestáveis, é o principal fator que influencia a qualidade dos produtos lácteos fabricados com matéria prima mantida a

7°C ou menos por períodos prolongados. A inativação completa dessas enzimas pelos tratamentos térmicos adotados pela indústria de laticínios não é possível, considerando-se a sua elevada termorresistência (ZALL e CHAN, 1981).

Suhren (1989) afirma que dentre os psicrotróficos, o gênero mais frequentemente isolado do leite refrigerado é o das *Pseudomonas*, sendo as espécies *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. putida* e *P. putrefaciens* as que têm papel relevante na qualidade do leite fluído e demais derivados lácteos. No leite “in natura” refrigerado, a espécie *P. fluorescens* é predominante sobre as demais espécies (DESMASURES e GUEGUEM 1997; RYSER, 1999; ENEROTH et al., 2000;). Adams et al. (1997) mostraram que 70 a 90% dos psicrotróficos isolados de leite cru, estocado a 4°C por período correspondente a uma semana, foram identificados como sendo *Pseudomonas*. Eneroth et al. (2000) verificaram que espécies de *Pseudomonas* constituíram de 72 a 77% dos isolados em amostras de leite cru, leite pasteurizado e amostras ambientais de indústrias de laticínios.

Entretanto, apesar do potencial deteriorante, nem todas as espécies do gênero *Pseudomonas* são capazes de produzir proteases, lipases e lecitinases, enzimas esta responsáveis por promover a deterioração do leite (WIEDMANN et al., 2000; DOGAN e BOOR, 2003). Kohlmann et al. (1991) verificaram que entre seis isolados psicrotróficos de leite, *P. fluorescens* e *P. fragi* produziram maiores quantidades de proteases extracelulares. Em outro estudo, a avaliação de 66 isolados de *Pseudomonas* provenientes de leite cru e processados indicou que 58% eram proteolíticos (WIEDMANN et al., 2000). Já Dogan e Boor (2003) identificaram 338 isolados de leite como *Pseudomonas*, dos quais 51% eram *P. fluorescens*, sendo que 69% das estirpes desses isolados eram produtores de enzimas proteolíticas.

6.1.5. *Pseudomonas* sp.

As *Pseudomonas* são bacilos retos ou levemente encurvados, móveis devido a presença de um ou mais flagelos polares, gram negativos e que podem mostrar-se sozinhos, em pares ou em pequenas cadeias. São bactérias aeróbicas, não formadoras de esporos, fermentadoras de glicose e outros carboidratos, e pertencentes à família Pseudomonadaceae. (KISKA e GILLIAN, 2003).

A *Pseudomonas aeruginosa*, principal espécie do gênero, produz pigmentos fluorescentes e solúveis em água, como a piocianina e a pioverdina. A piocianina é produzida por mais da metade dos isolados, apresenta-se azul ou verde em pH neutro ou alcalino, sendo a responsável pela origem do nome. Alguns isolados produzem também outros pigmentos

hidrossolúveis como piorrubina (avermelhado) ou piomelanina (marrom a preto) (POLLAK, 1995). Trata-se de bactérias ubiquitárias na natureza e que não tem grandes exigências nutritivas, o que faz com que possam estar em qualquer local, além de possuírem uma versatilidade em termos de temperatura e condições ambientais. Sobrevivem, sobretudo, a pH neutro, tendo um leque muito grande de temperaturas a que conseguem sobreviver, entre os 4°C e os 43°C (VILAÇA, 2007).

A *Pseudomonas* sp. é classificada como uma bactéria psicotrófica, responsável pela liberação de enzimas lipolíticas e proteolíticas durante o tratamento térmico, alterando deste modo as características organolépticas dos produtos lácteos. A maioria dos membros do gênero *Pseudomonas* sp. encontram-se no solo e água, caracterizado-se como microrganismos ambientais. Assim, a presença desta espécie de bactéria nas amostras de leite implica em precárias condições de higiene durante sua manipulação, índices elevados de mastite clínica e subclínica e refrigeração inadequada (GASPAROTTO et al., 2009).

6.2. ACOMPANHAMENTO

6.2.1. Apresentação do projeto de mestrado

O projeto intitulado “Caracterização microbiológica de leite de cabra na região de Viçosa, MG, e identificação da atividade proteolítica de *Pseudomonas* spp. isolados desse produto” tem como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de leite de cabra cru, por meio de pesquisa de microrganismos indicadores de higiene e *Pseudomonas* spp.

Por se tratar de um projeto de mestrado ainda em andamento, algumas etapas não foram acompanhadas, sendo que só serão aqui relatados os procedimentos seguidos durante o período de estágio. Os resultados já obtidos também não serão divulgados por razão de exclusividade em publicação, sendo que as informações aqui contidas tiveram a permissão expressa do autor principal do projeto.

6.2.2. Materiais e Métodos

O trabalho será realizado em três etapas: a primeira etapa compreendeu à identificação das propriedades leiteiras de caprinos na região, coleta de amostras e análises microbiológicas (aeróbios mesófilos, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae* spp., psicotróficos totais, psicotróficos proteolíticos, enumeração e isolamento de *Pseudomonas* spp, bem como a pesquisa de patógenos como *Salmonella* spp e *Listeria* sp); a segunda etapa irá corresponder à identificação por PCR dos isolados de *Pseudomonas* spp. e detecção de gene associado à produção de enzima proteolítica metaloprotease alcalina (*apr*); e a terceira

etapa irá corresponder testes *in vitro* em leite de cabra microfiltrado e inoculado artificialmente com isolados de *Pseudomonas* spp. com atividade proteolítica, sendo estes os microrganismos isolados na segunda etapa, conservados em diferentes condições e verificando-se sua multiplicação e deterioração da caseína.

Como mencionado anteriormente, somente a primeira etapa foi acompanhada durante o período de estágio, portanto, as outras 2 etapas não serão relatadas.

6.2.2.1. Coleta de amostras e diluições

As amostras foram adquiridas de propriedades que fornecem a sua produção para CCA Laticínios (Caprilat), sendo elas localizadas na região da Zona da Mata de Minas Gerais (Figuras 35 e 36). Na primeira visita, foi aplicado um questionário de múltipla escolha para caracterizar as propriedades rurais selecionadas, abrangendo as seguintes informações: raça do rebanho, produtividade, número de animais em lactação, sistema de produção (intensivo, semi-intensivo ou extensivo), tipo de ordenha (mecânica, manual, em sistema aberto ou fechado), controle de mastite, boas práticas de obtenção do leite (pré-dipping, descarte de primeiros jatos, pós-dipping) e tipos de conservação do leite cru (refrigeração, congelamento, temperatura ambiente).



FIGURA 35: Uma das propriedades selecionada para coleta das amostras na região da Zona da Mata em Minas Gerais com ordenha manual.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

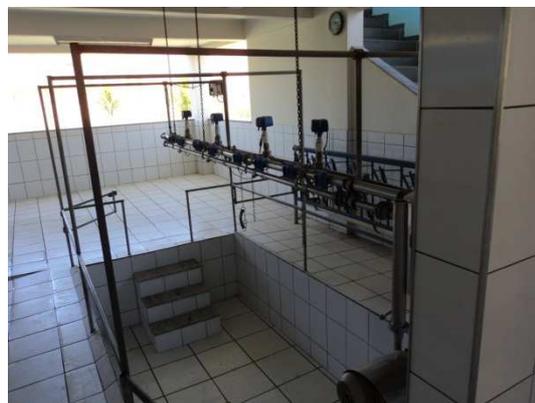


FIGURA 36: Uma das propriedades selecionada para coleta das amostras na região da Zona da Mata em Minas Gerais com ordenha mecânica.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

Foram coletados aproximadamente 500 mL de leite provenientes de tanques de refrigeração contendo o leite da ordenha do dia anterior ou do próprio dia pertencentes a cada uma das propriedades selecionadas (Figura 37). As amostras foram acondicionadas individualmente em garrafinhas de vidro (Figura 38) estéreis e mantidas sob refrigeração durante o transporte até o LIPOA da UFV. Em condições assépticas, as amostras de leite foram submetidas a diluição seriada em escala decimal, preparadas com solução de NaCl 0,85% para possibilitar a realização das análises microbiológicas.



FIGURA 37: Tanque de resfriamento para armazenar o leite de cabra coletado.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 38: Coleta da amostra em garrafinhas de vidro.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

6.2.2.2. Análises microbiológicas

Para enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos, foram utilizadas placas Petrifilm™ AC (3M Microbiology, St. Paul, MN, USA), com incubação a 35°C por 48 horas, sendo escolhidas as diluições 10^{-4} e 10^{-5} de cada amostra para serem semeadas (Figura 39). Após incubação, todas as colônias vermelhas formadas foram enumeradas e o resultado final expresso em Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL).

Duas diluições (10^{-1} e 10^{-2}) de cada amostra também foram selecionadas para serem semeadas em Petrifilm™ EC (3M Microbiology) para enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli*, com incubação a 35°C por 48 horas (Figura 40 e 41). Após incubação, as colônias formadas na área de inoculação (colônias vermelhas com presença de gás eram classificadas com coliformes totais e colônias azuis com presença de gás eram classificadas com *E. coli*) foram enumeradas e o valor final expresso em UFC/mL.

Enterobactérias foram enumeradas em Petrifilm™ EB (3M Microbiology), com semeadura de duas diluições (10^{-1} e 10^{-2}) selecionadas de cada amostra, e incubação a 35°C por 48 horas (Figura 42). Após incubação, as colônias formadas na área de inoculação (colônias vermelhas com zonas amarelas ao redor, com ou sem produção de gás) eram enumeradas e o valor final expresso em UFC/mL.

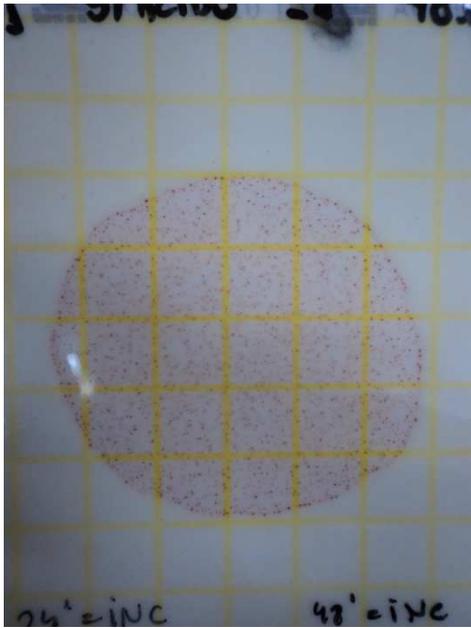


FIGURA 39: Placa de Petrifilm utilizada para enumeração de bactérias aeróbias mesófilas.

FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 40: Placa de Petrifilm utilizada para enumeração de coliformes totais e *E. coli*. Os pontos azuis indicam crescimento de *E. coli*.

FONTE: Arquivos pessoais, 2011

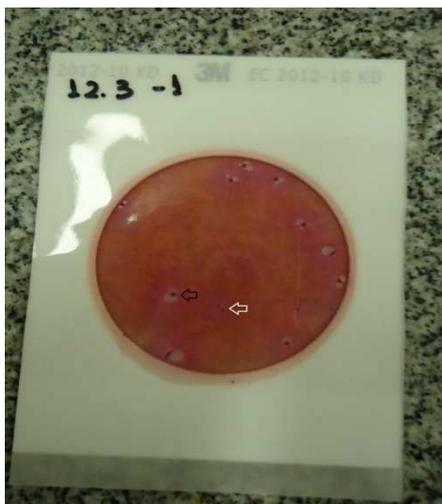


FIGURA 41: Placa de Petrifilm utilizada para enumeração de coliformes e *E. coli*. A seta preta indica o crescimento de coliformes totais já que há a presença de gás. A seta branca não serve para contagem, pois não há formação de gás.

FONTE: Arquivos pessoais, 2011

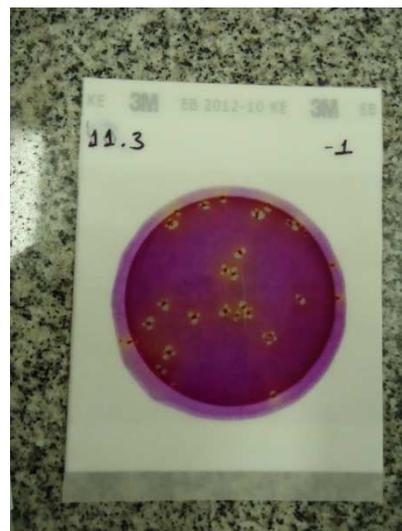


FIGURA 42: Placa de Petrifilm utilizada para enumeração de Enterobactérias, sendo que a formação da coloração amarela ao redor da colônia indica o crescimento.

FONTE: Arquivos pessoais, 2011

Para enumeração de psicrotróficos totais/proteolíticos, a metodologia utilizada foi a descrita por Downes e Ito (2001), onde as diluições 10^{-4} e 10^{-5} de cada amostra foram selecionadas e alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em duplicata e por superfície em placas contendo Agar padrão de contagem (PCA), adicionado de leite desnatado estéril (10%) (Skim Milk Agar - SMA), previamente distribuído e solidificado. Após semeadura, as placas foram incubadas a 7 °C por 10 dias, sendo contadas as colônias sem halo para a enumeração de psicrotróficos totais e as colônias que formaram halos de proteólise para enumeração de psicrotróficos proteolíticos (Figura 43). Os resultados foram todos expressos em UFC/mL.

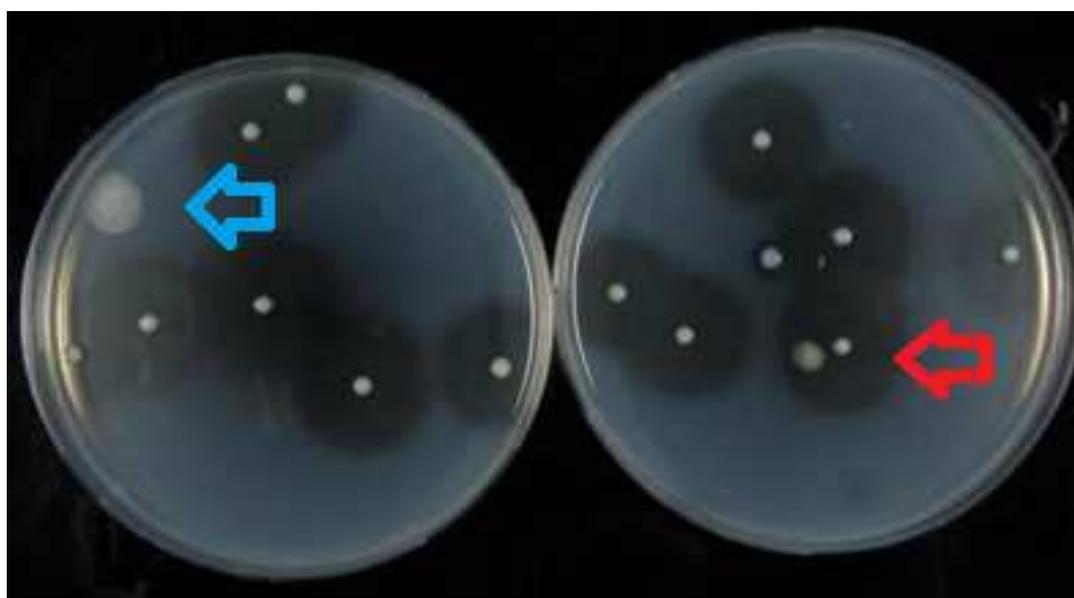


FIGURA 43: Placas para enumeração de bactérias psicrotróficas. A seta azul indica bactérias não proteolíticas, já que não há formação de halo. A seta vermelha indica a formação de halo e com isso a bactéria é classificada como proteolítica.

FONTE: Arquivos pessoais, 2011

Para enumeração de *Pseudomonas* spp. foi utilizado o protocolo ISO 11059 (ISO, 2009), onde duas diluições (10^{-2} e 10^{-3}) selecionadas foram semeadas por superfície (alíquotas de 0,1 mL) e em duplicata em placas contendo Agar base *Pseudomonas*, sendo este suplementado com Penicilina G sódica (10^5 UI/L) e Pimaricina (0,01 g/L) e adicionado com leite em pó desnatado estéril (10%). Após semeadura, as placas foram incubadas a 25 °C por 72 horas. Quando ocorreu a formação de halo de proteólise, as colônias foram classificadas como *Pseudomonas* spp. proteolíticas (Figura 44) e quando não houve a formação do halo, elas foram classificadas em *Pseudomonas* spp. (Figura 45). O resultado final foi expresso em UFC/mL.

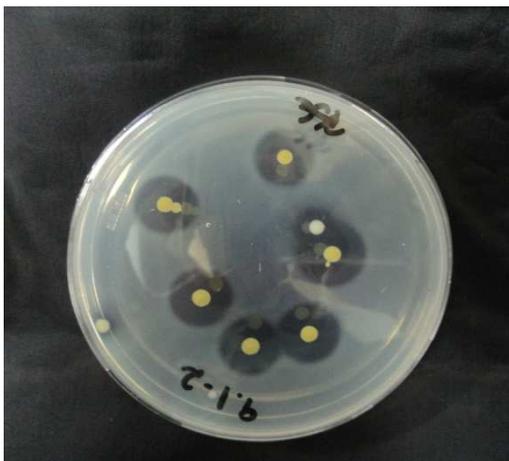


FIGURA 44: Bactérias classificadas como *Pseudomonas* proteolíticas já que houve a formação do halo em agar *Pseudomonas*.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

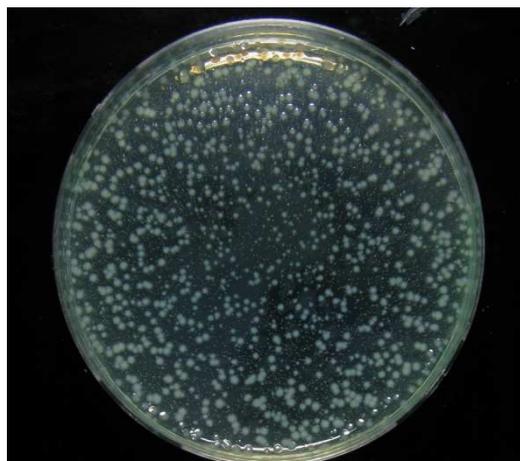


FIGURA 45: Bactérias classificadas como *Pseudomonas* spp. já que não houve a formação do halo em agar *Pseudomonas*.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

Foram feitas análises para dois microrganismos patogênicos, sendo estes *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*. Para *Salmonella* spp o método microbiológico convencional utilizado foi o da ISO 6579:2001 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2002), já descrito no presente relatório (Figuras 46 e 47).

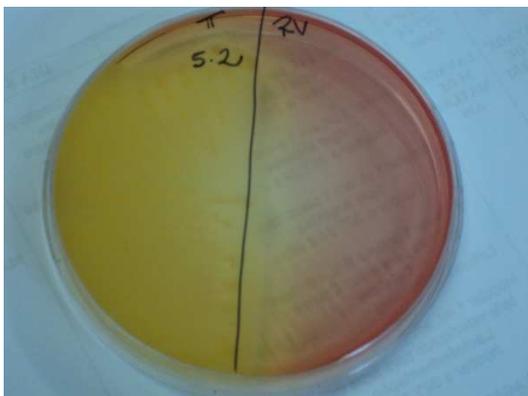


FIGURA 46: Crescimento de colônias não típicas de *Salmonella* em agar XLD, sendo o resultado negativo.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 47: Crescimento de colônias típicas de *Salmonella* em agar MLCB, porém, após realizado o teste de aglutinação, o resultado foi negativo.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

Para análise de *Listeria monocytogenes* foi utilizado o *standard methods* (FDA, 2011), onde 25 mL de leite foram transferidos para uma *bag* estéril contendo 225 mL de caldo triptona de soja suplementado com extrato de levedura 0,6% (TSB-YE) ou em caldo de enriquecimento para *Listeria* (TEB) que foram incubados a 35°C por 4 horas e depois

suplementado com 0,5 mL de suplemento seletivo de *Listeria* SR0141E (fase de pré enriquecimento) e novamente incubado por 18 horas a 35°C (Figuras 48 e 49). Após o enriquecimento, foram feitas estrias em placas contendo agar Palcam (Oxoid CM0887 e Oxoid SR0150E) e agar Oxford (Oxoid CM0862 e Oxoid SR0140) e estas incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias típicas de *Listeria* (colônias com cor cinzenta esverdeada com halo preto ao redor em ambos os agars) foram semeadas em tubos contendo agar triptona de soja suplementado com extrato de levedura (TSA-YE) e os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas, caso houvesse crescimento o resultado da amostra era considerado positivo para *Listeria monocytogenes*.

Para comparação das colônias típicas de *Listeria* em agar Palcam e Oxford, foi utilizada uma ATCC – *American Type Culture Collection* (cultura de bactérias sorotipadas em arquivos), a *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (Figuras 50 e 51).

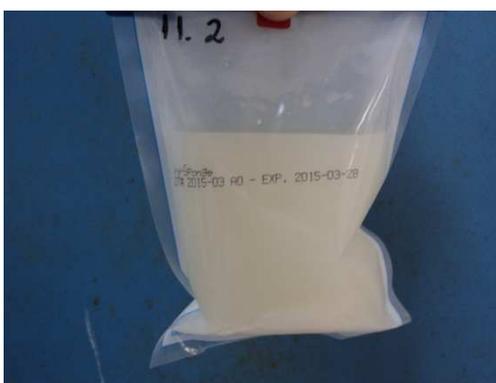


FIGURA 48: *Bag* estéril contendo 225 mL de TEB mais 25 mL de leite de cabra (amostra) sem o suplemento para a *Listeria*.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011



FIGURA 49: *Bag* estéril contendo 225 mL de TEB mais 25 mL de leite de cabra (amostra) contendo o suplemento seletivo de *Listeria* SR0141E.
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

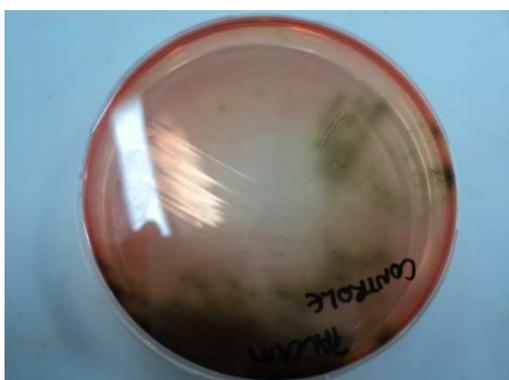


FIGURA 50: Crescimento da ATCC 7644 (*Listeria monocytogenes*) em agar Palcam (controle).
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

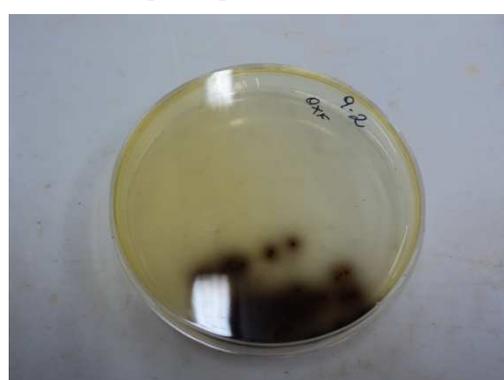


FIGURA 61: Crescimento da ATCC 7644 (*Listeria monocytogenes*) em agar Oxford (controle).
FONTE: Arquivos pessoais, 2011

Não houve crescimento em placa (tanto de Oxford como Palcam) em nenhuma amostra de leite de cabra coletada, por isso não foi realizada nenhuma análise em TSA-YE.

6.3. Conclusão

Devido a facilidade e o baixo custo de produção do leite bovino, o leite de cabra acaba ficando em segundo plano, sendo mais consumido por pessoas que possuem algum tipo de alergia ao leite bovino ou em regiões onde a criação de caprinos é mais exploradas, como por exemplo, o Nordeste brasileiro.

Por ser um alimento que vem ganhando espaço no mercado mundial, o leite de cabra passou a ser mais fiscalizado principalmente na parte de controle sanitário e, com isso, passou a ter uma preocupação maior quanto ao seu acondicionamento logo após a ordenha, já que essa fase é considerada a mais importante quanto à contaminação.

A refrigeração é a melhor maneira de se acondicionar o leite, pois ela inibe o crescimento da maioria dos microrganismos patogênicos. Porém, se toda a etapa da ordenha e do armazenamento for feita de forma correta, ou seja, a mais “limpa” possível, a integridade do leite de cabra vai ser preservada e não vai ocorrer a contaminação.

7. CONCLUSÃO GERAL

O estágio supervisionado realizado na Universidade Federal de Viçosa em Minas Gerais foi de suma importância para a conclusão do curso de Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Maringá, uma vez que o estágio proporcionou um contato direto com a prática, além de ter possibilitado uma visão diferente do assunto abordado.

A UFV me ofereceu uma ótima estrutura, tanto em termos tecnológicos como profissional, desta forma, pude aprimorar meus conhecimentos adquiridos durante todo o curso de graduação, assim como adquirir novos aprendizados.

Outro ponto positivo do estágio supervisionado é que ele proporciona, mesmo que por um período curto, o contato direto com a carreira de uma forma profissional e não só acadêmica, nos preparando para a “vida real” que enfrentamos após a faculdade.

Enfim, o estágio supervisionado corroborou ainda mais para minha decisão em continuar na “vida” acadêmica, com pesquisas e tentando contribuir para melhorar a qualidade dos alimentos que chegam até o consumidor.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, B.M.; BARACH, J.T.; SPECK, M.L. **Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin.** Journal of Dairy Science, v.58, n.6, p.828-835, 1975.
- ANUÁRIO MILKBIZZ. **Leite sai do latão e entra pelo cano.** São Paulo: Editora Milkbizz; 1996.
- BAILEY, S.; et al. *Salmonella*. In: JUNEJA, V.K.; SOFOS, J.N. Eds: **Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and Interventions.** Cap. 7, p. 108-118, Washington, DC: ASM Press, 2010.
- BORGES, C.H.P. **Custo de Produção de leite de cabra na Região Sudeste do Brasil.** In: Simpósio Internacional de Caprinos de Corte, 2, Simpósio Internacional sobre Agronegócio da Caprinocultura Leite, 1, João Pessoa/PB, Anais. João Pessoa/PB, p. 303-312, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa n. 37, de 31 de outubro de 2000. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra.** Brasília, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, 20 de setembro 2002.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 62 de 26/08/2003. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.** Diário Oficial da União, 18/09/2003, Seção 1, p.14, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim eletrônico epidemiológico – vigilância epidemiológica de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004,** ano 5, n.06, 2005. Disponível em <<http://www.saude.gov.br/svs>>, acesso em 01/11/2011.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacao_dta.pdf> acesso em: 01/11/2011.
- BUSSE, M. **Media for Salmonella.** International Journal of Food Microbiology, v.26, p.117-31, 1995.
- BUZBY, J. C, ROBERTS, T. **The Economics of Enteric Infections: Human Foodborne Disease Costs.** Gastroenterology. 2009; 136:1851–62.
- CARMO, G. M. I., et al. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004.** Boletim Eletrônico Epidemiológico, ano 5, n.6, 2005. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf> acesso 15/10/2011.

CARVALHO, E.P. **Microbiologia de alimentos**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, p.128, 2001.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Salmonella**. 2002 Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>>, acessado em: 09/10/2011.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention - **Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks - United States, 1998-2002**. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 2006. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5510a1.htm#top>>, Acesso em: 20/10/2011.

CFSAN/FDA – CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Foodborne pathogenic microorganism and natural toxins handbook. “Bad Bug Book”**. 2008. Disponível em: <<http://cfsan.fda.gov/~now/chap1.html>>, acessado em: 07/10/2011.

CLARK, S. **Comparing milk: human, cow, goat & commercial infant formula**. 2005 Disponível em: <<http://www.saanendoah.com/compare.html>> acessado em 30/10/2011.

CORDEIRO, P.R.C. **Mercado do leite de cabra e de seus derivados**. Revista CFMV. Brasília/DF -Ano XII- n°39, 2006

CORREIA, R.C.; MOREIRA, J.N.; ARAÚJO, J.L.P. **Importância social e econômica da caprino-ovinocultura no Vale do Rio Gavião-BA: elementos para tomada de decisão**. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido; Salvador: CAR, 39p, 2001.

D’Aoust, J. Y., MAURER, J. **Salmonella species**. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R., eds. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 3 ed. Washington: ASM Press, 2007.

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, fourth edition, ed: apha, v.4, p.676, 2001.

DE BOER, E. **Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods**. International Journal of Food Microbiology, v.45, p.43-53, 1998.

DESMASURES, N.; GUEGUEN, M. **Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years**. Journal of Dairy Research, v.64, p.271-280, 1997.

DOGAN, B.; BOOR, K.J. **Genetic diversity and spoilage potentials among Pseudomonas spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants**. Applied and Environmental Microbiology, v.69, p.130-138, 2003.

EDUARDO, M. B. P.; et al. **Salmonella Enteritidis – Uma importante causa de surtos bacterianos veiculados por alimentos e a necessidade de uma nova regulamentação sanitária para os alimentos implicados, São Paulo, Brasil, 1999-2003**. Boletim Epidemiológico Paulista, v.1, n.8, p. 6-11, 2004.

EDUARDO, M. B. P., KATSUYA, E. M. BASSIT, N. P. **Características dos surtos de doenças transmitidas por alimentos associados a restaurantes no estado de São Paulo - 1999-2002.** Higiene Alimentar, 17 (104/105, encarte): 60-61, 2003.

EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agent and Food-borne.** The EFSA Journal, v. 9, n. 3, 2011.

EHLN, T., DUBEAU, L. **Detection of ras point mutations by polymerase chain reaction using mutation-specific, m inosine containing oligonucleotide primers.** Biochem Biophys. Res. Commun. v.160, p.441-7, 1989.

ENEROTH, A.; AHRNE, S.; MOLIN, G. **Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD).** International Dairy Journal, v.10, p.325-331. 2000.

FAO – **Food and Agriculture Organization.** Disponível em: <www.fao.org>, acessado em: 20/10/2011.

FDA. BAM: **Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria.** Bacteriological Analytical Manual, setembro de 2002. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm064948.htm#fn14>>. Acesso em 28/10/2011.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*.** 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/scienceresearch/laboratorymethods/bacteriologicalanalyticalmanualbam/ucm071400.htm>>, acessado em 03/11/2011.

FISBERG, M., et al. **Aceitação e tolerância de leite de cabra em pré-escolares.** Revista de Pediatria Moderna, São Paulo, v.35, n.7, 1999

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. FAO. Banco de dados FAOSTAT. Disponível em: <<http://apps.fao.org>> Acessado em: 16/10/2011.

FONSECA, L.F.L., SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite.** São Paulo: Lemos Editorial, p.175, 2000.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar.** 1ª edição. Porto Alegre: Artmed, 424p, 2000.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar.** Porto Alegre: Artmed. 424 p, 2002

FORSYTHE, S.J. **Microbiology of Safe Food.** 2 ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2010.

GASPAROTTO, P.H.G., et al. **Isolamento e identificação da bactéria *Pseudomonas* so. em amostras de leite in natura.** Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná, 2009.

GERMINI, A.; MASOLA, A.; CARNEVALI, P.; MARCHELLI, R. **Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR.** Food Control, v.20, p.733-8, 2009.

GEUS, J. A. M; LIMA, I. A. **Análise de coliformes totais e fecais: Um comparativo entre técnicas oficiais VRBA e Petrifilm EC aplicados em uma indústria de carnes.** In: II Encontro de Engenharia e Tecnologia dos Campos Gerais, 2006, Ponta Grossa, Paraná, 2006.

GREIG, J.D, LEE, M.B. **Enteric outbreaks in long –term care facilities and recommendations for prevention: a review.** Epidemiol. Infect. v.137, p.145–55, 2009.

GREIG, J.D, RAVEL, A. **Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution.** International Journal of Food Microbiology. v.130, n.2, p.77–87, 2009.

GUIBOURDENCHE M.; et al. **Weill F.X. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme.** Research in Microbiology, v.161, n.1, p.26-9, 2010.

GUPTE, A. R.; REZENDE, C. L. E.; JOSEPH, S. W. **Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104.** Applied and Environmental Microbiology, v. 69, n.11, p. 6669-75, 2003.

HAENLEIN, G.F.W. **Goat milk in human nutrition.** Small Ruminant Research, Amsterdam, v51, p. 155-163, 2004.

HENAO, O.L, et al. **Methods for Monitoring Trends in the Incidence of Foodborne Diseases: Foodborne Diseases Active Surveillance Network 1996–2008.** Foodborne Pathogens and Disease, 2010.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS, M.F. **Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v.17, n.2, p.55-62, 1997.

IBGE – **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Disponível em <www.ibge.gov.br>, acessado em: 20/10/2011.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 4th ed, 2002

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, **ISO/TS 11059. Milk and milk products — Method for the enumeration of *Pseudomonas* spp.,** 14 p., 2009.

KANKI, M.; et al. **Effect of sample preparation and bacterial concentration on *Salmonella enterica* detection.** In: POULTRY MEAT USING CULTURE METHODS AND PCR ASSAYING OF PREENRICHMENT BROTHS. Food Microbiology, v.2009, p.1-3, 2009.

KISKA, D. L e GILLIAN, P. H. *Pseudomonas*. In: **Manual of Clinical Microbiology.** MURRAY, P. R., et al. ed, 8th ed. Manual of clinical microbiology. American Society for Clinical Microbiology, Washington DC, 2003.

KOHLMANN, K.L.; et al. **Production of proteases by psychrotrophic microorganism.** Journal of Dairy Science, v.74, p.3275-3283, 1991.

JAY, J.M.; trad. TONDO, E.C. et al. **Microbiologia de Alimentos.** 6ª edição – Porto Alegre: Artmed, 2005

KORSAK, N.; CLINQUART, A.; DAUBE, G. **Salmonella spp. Dans les denrées alimentaires d'origine animale: un réel problème de santé publique?** Anales de médecine vétérinaire, n.148, p. 174-193, 2004.

KOTTWITZ, L.B.M., et al. **Contaminação por Salmonella spp. em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.60, n.2, p.496-8, 2008.

LEITE JR, A.F.S., et al. **Qualidade microbiológica do leite tipo C pasteurizado, comercializado em João Pessoa, Paraíba.** Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 14, n. 74, p. 45-49, 2000.

LIM, H.; et al. **Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of Salmonella spp.** International Journal of Food Microbiology, v.105, p.411-8, 2005.

LYNCH, M., et al. **Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1998–2002.** Mortality and Morbidity Weekly Report, v. 55, p.1–34, 2002.

MALORNY, B., et al. **Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR towards an international standard.** Applied Environmental Microbiology, v.69, n.1, p.290–6, 2003.

MICHELIN, A.F. **Surto de intoxicação alimentar estafilocócica no município de Birigui, São Paulo.** Rev. Inst. Adolfo Lutz. v.65, p.46-9, 2006.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed reaction.** Methods Enzymol. v.155, p.335-50, 1987.

MÜRMAN, L., et al. **Quantification and molecular characterization of Salmonella isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil.** Brazilian Journal of Microbiology, 39: 529-534, 2008

NERO, L. A., et al. **Interference of raw milk autochthonous microbiota on the performance of conventional methodologies for Listeria monocytogenes and Salmonella spp. detection.** Microbiological Research, 164, 529-35, 2009.

OIE (Escritório Internacional de Epizootias). **Salmonellosis.** Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5 ed., 2004. Disponível em: http://www.oie.int/eng/norms/mmanual/A_00129.htm, acessado em: 03/11/2011.

OLIVER, J. D. **Viable but nonculturable state in bacteria.** Journal of Microbiology, v. 43, p. 93-100, 2005.

PADILHA, M.R.F., et al. **Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.34, p.167-171, 2001.

PAKALNISKIENE, J., et al. **A foodborne outbreak of enterotoxigenic *E. coli* and *Salmonella Anatum* infection after a high-school dinner in Denmark, November 2006.** Epidemiol. Infect. v.137, p.396–401, 2009.

PANUTDAPORN, N.; et al. **Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella* Typhimurium strain LT2.** International Journal of Food Microbiology, v. 106, p. 241-247, 2006.

PERREIRA, M.S.; SILVA, P.L. **Prevalência de anticorpos contra *Salmonella pullorum* e identificação bacteriológica de *Salmonella* sp. em galinhas “caipiras” em Uberlândia (MG).** Guia avicultura industrial, n.6, p.22-23, 2005.

PIGOTT, D.C. **Enfermedades asociadas a los alimentos.** Rev. Chil Infect. v.25, p.395-9, 2008.

PINTO, C.L.O., et al. **Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 26, n. 3, 2006.

PIRISI, A.; LAURET, A.; DUBEUF, J. P. **Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality.** Small Ruminant Research, v. 68, p. 167-178, 2007.

POLLACK M. 1995. ***Pseudomonas aeruginosa*.** In: MANDELL, D.; BENNETHS, J. e DOLIN, R. eds. Principles and practice of infections diseases. Churcuil Livingstone, New York, 1995

RASSCHAERT, G., et al. **Comparison of Five Repetitive-Sequence-Based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* Isolates.** Journal of Clinical Microbiology, v.43, n.9, p.3615-23, 2005.

ROWAN, N.J. **Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis?** Trends in Food Science & Technology, v.15, p.462-7, 2004.

RYSER, E. **Microrganisms of importance in raw milk.** Michigan Dairy Review, v. 8, p. 7-9, 1999.

SAIKI, R.K. et al. **Enzymatic amplification of (globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.** Science v.230, p.1350-1354, 1988.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Saúde. Sistema Único de Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. 2006. **Manual de orientação para investigação em surtos de DTA.** 20 p. Disponível em: http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/manuais_cartilhas/Manual_de_Orientacao_para_Investigacao_em_Surtos_de_DTA.pdf, acesso: 25/10/2011.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Bactérias psicotróficas e a qualidade do leite**. Revista CBQL, v.19, p.12-15, 2003.

SANTOS, M.V.; LARANJA, F.L.F. **Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite**. Revista Higiene Alimentar, v.15, n.82, p.13-19, 2001.

SILVA, E. N., et al. **Efeitos dos probióticos e antibióticos sobre as vilosidades e pH do trato gastrointestinal de frangos de corte**. Ciência agrotécnica, Lavras/MG, v.24, p. 163-173, 2000.

SILVA JR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação**. 6 ed. São Paulo: Ed Varela. 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 317p, 1997.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. **Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects**. Trends in Food Science and Technology, v. 8, p. 35-41, 1997.

SUHREN, G.; MCKELLER, R.C. **Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food**. CRC. Press. Boca Raton, fl. 310, 1989.

SVS – SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004**. Boletim eletrônico ano 5, n. 6, p. 2-7, 2005.

SVS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2009**. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf>. Acesso em: 09 de maio de 2011.

TAUXE, R.V. **Emerging foodborne pathogens**. International Journal of Food Microbiology. v.78 p.31–41, 2002.

TAUXE, R.V, et al. **Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infection**. International Journal of Food Microbiology. v.139 p.16–28, 2010.

TIMM, C.D; et al. **Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado integral produzido em microusinas da região sul do Rio Grande do Sul**. Revista Higiene Alimentar. São Paulo, v. 17, n. 106, p. 100-104, 2003.

UYTTENDAELE, M., VANWILDEMEERSCH, K.; DEBEVERE, J. **Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella***. Letters in Applied Microbiology, v.37, p.386-91, 2003.

VILAÇA, M.J.L. Aula de microbiologia: Pseudomonadaceae e Vibrionaceae. Portugal, 2007.

WELKER, C.A.D; et al. **Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.** Rev. Bras. De Biociências. 2010; 8:44-8.

WHEELER, J.G.; et al. **Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance.** British Medical Journal, v.318, p.1046-1050, 1999.

WIEDMANN, M., et al. **Molecular and phenotypic characterization of Pseudomonas spp. Isolated from milk.** Applied and Environmental Microbiology. v.66, p.2085-2095, 2000.

ZALL, R.R.; CHAN, J.H. **Heating and storing milk on dairy farms pasteurization in milk plants.** Journal of Dairy Science, Lancaster, v.64, p.1540-1544, 1981.