

Universidade Federal de Juiz de Fora

Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados

JAQUELINE FLAVIANA OLIVEIRA DE SÁ

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE DOCE DE LEITE, LEITE
CONDENSADO E QUEIJO MINAS PADRÃO POR METODOLOGIA CLÁSSICA E
PADRONIZAÇÃO DE MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS POR
PCR EM TEMPO REAL**

Juiz de Fora

2012

JAQUELINE FLAVIANA OLIVEIRA DE SÁ

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE DOCE DE LEITE, LEITE
CONDENSADO E QUEIJO MINAS PADRÃO POR METODOLOGIA CLÁSSICA E
PADRONIZAÇÃO DE MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS POR
PCR EM TEMPO REAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Qualidade do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Fonseca Martins

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva

JUIZ DE FORA
2012

JAQUELINE FLAVIANA OLIVEIRA DE SÁ

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE DOCE DE LEITE, LEITE
CONDENSADO E QUEIJO MINAS PADRÃO POR METODOLOGIA CLÁSSICA E
PADRONIZAÇÃO DE MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS POR
PCR EM TEMPO REAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Qualidade do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone
Universidade Federal de Viçosa

Dr. João Batista Ribeiro
Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof.^a Dr.^a. Marta Fonseca Martins
Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora
2012

Sá, Jaqueline Flaviana Oliveira.

Caracterização microbiológica de doce de leite, leite condensado e queijo Minas Padrão por metodologia clássica e padronização de multiplex para detecção de patógenos por PCR em tempo real. / Jaqueline Flaviana Oliveira de Sá. – 2012.

112 f.

Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. Indústria de Laticínios. 2. Leite. I. Título.

CDU 637.13

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu zeloso guardador, por me proporcionar mais esta conquista.

À minha família, pelo incentivo e apoio incondicional, mesmo estando geograficamente distantes.

Ao meu noivo Michael, pelo amor, carinho, incentivo, companheirismo e paciência.

À Dra. Marta Fonseca Martins, peça principal para a concretização deste trabalho. Obrigada por me apresentar o universo da Genética Molecular. Serei sempre grata pelos valiosos ensinamentos, pela excelente orientação e pelos bons exemplos de conduta ética na vida profissional. Meu sincero respeito e admiração.

Ao Dr. Paulo Henrique Silva pelo apoio e oportunidades.

À doutoranda Isabela Fonseca, pela ajuda imprescindível, pela paciência e disponibilidade. Serei eternamente grata.

A todos os meus colegas de laboratório da Epamig/Instituto de Laticínios Cândido Tostes, em especial à Dona Alcy, e da Embrapa Gado de Leite, pelo agradável convívio, pelo companheirismo e pela amizade.

À UFJF, Epamig, Embrapa Gado de Leite, Fapemig e Pólo de Excelência do Leite, por me proporcionarem oportunidades de realização deste mestrado.

E a todos que de alguma maneira colaboraram para a concretização deste trabalho.

A todos, meu sincero muito obrigado!

RESUMO

Os derivados lácteos são alimentos com excepcional valor nutritivo e amplamente consumido pela população de vários países. Entretanto, são também excelentes meios de cultura para muitos micro-organismos, sendo, portanto, passíveis de contaminação por diferentes agentes microbiológicos, podendo levar a doenças manifestadas por ação de patógenos ou por suas toxinas. A obtenção de alimentos seguros depende, dentre outros fatores, dos métodos de análises utilizados, os quais devem fornecer resultados rápidos e confiáveis que permitam o monitoramento da segurança microbiológica de alimentos, pela indústria e pelos órgãos de fiscalização e para isto, diversos métodos alternativos têm sido desenvolvidos para detecção e quantificação de patógenos. O primeiro objetivo do presente estudo foi caracterizar microbiologicamente, por metodologia clássica, amostras de doce de leite, leite condensado e queijo Minas Padrão, produzidos em vários estados do Brasil. Foram feitas análises de contagem padrão em placas de mesófilos, bolores e leveduras, coliformes a 30°C e a 45°C, *Staphylococcus* spp. coagulase positiva e negativa, além da pesquisa de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. Altas contagens padrão em placas de mesófilos, leveduras e *Staphylococcus* spp. coagulase negativa foram encontradas nos três produtos. O segundo objetivo foi desenvolver uma metodologia alternativa à clássica, que apresentasse resultados mais rápidos e de alta especificidade para a detecção dos principais patógenos contaminantes de produtos lácteos e transmissores de doenças de origem alimentar, utilizando a técnica de PCR em tempo real. Foi padronizada uma reação *multiplex* para detecção de *Salmonella enterica* var Thyphimurium e *Staphylococcus aureus*. O presente trabalho contribuirá com a rara literatura mundial sobre a microbiota contaminante do doce de leite, leite condensado e queijo Minas Padrão, fornecendo dados científicos à academia, às autoridades regulamentadoras e indústria, vislumbrando a possibilidade da utilização de métodos de diagnóstico microbiológico alternativos aos clássicos, que forneçam resultados cada vez mais rápidos e sensíveis.

Palavras-chave: lácteos, alimento seguro, métodos moleculares.

ABSTRACT

Dairy products are food with exceptional nutritional value and are widely consumed by the population of various countries. However, they are also excellent culture medium for many micro-organisms, and is therefore liable to contamination by different microbiological agents which may lead to diseases manifested by the action of pathogens or their toxins. The attainment of safe food depends, among other factors, of the analysis methods used, which should provide fast and reliable results that allow the monitoring of microbiological safety of food, by the industry and the supervisory bodies and for this, alternative methods have been developed for detection and quantification of pathogens. The first objective of this study was to characterize microbiologically, by conventional method, samples of doce de leite, condensed milk and standard Minas cheese, produced in several states in Brazil. Standard count analysis were made in standard plate for mesophyll, yeasts and molds, coliforms at 30°C and 45°C, *Staphylococcus* spp. coagulase positive and negative, as well as *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes*. High standard counts on plates of mesophyll, yeasts and *Staphylococcus* spp. coagulase-negative were found in three products. The second objective was develop an alternative methodology to the classical, to produce faster and of high specificity results for detection of main pathogen contaminants of dairy products and transmitting of food diseases, using real-time PCR technique. A multiplex reaction was standardized for detection of *Salmonella enterica* var Thyphimurium and *Staphylococcus aureus*. This work will contribute to the rare literature on microbial contaminants of doce de leite, condensed milk and standard Minas cheese, providing scientific data to the academy, regulatory authorities and industry, envisioning the possibility of using alternative microbiological diagnosis methods instead of classic that provides faster and more sensitive results.

Keywords: dairy, food safe, molecular methods.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cinco principais patógenos que causam doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos	6
Tabela 2 - Sequencia dos <i>primers</i> e sondas utilizados no experimento	47
Tabela 3 - Concentrações de <i>primers</i> e DNA testadas nas reações <i>monoplex</i>	47
Tabela 4 - Concentrações de <i>primers</i> e DNA utilizadas nas reações <i>multiplex</i>	48
Tabela 5 - Perfil microbiológico de amostras de doce de leite.....	50
Tabela 6 - Perfil microbiológico de amostras de leite condensado.....	54
Tabela 7 - Perfil microbiológico de amostras de queijo Minas Padrão.....	57
Tabela 8 - Amplificação de DNA das bactérias no <i>multiplex</i> 1	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critérios microbiológicos e tolerância para doce de leite de acordo com a Portaria N° 354 de 1997 do MAPA	21
Quadro 2 - Critérios a serem adotados para a confirmação definitiva de <i>Salmonella</i> sp.	43
Quadro 3 - Resultado típico de <i>L. monocytogenes</i> nas provas bioquímicas	44
Quadro 4 - Condições da PCR em tempo real	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de fabricação do doce de leite	19
Figura 2 - Fluxograma da fabricação do leite condensado	23
Figura 3 - Corante SYBR <i>Green I</i> intercalando uma fita dupla de DNA formada durante a reação de PCR em tempo real	33
Figura 4 - Sonda <i>TaqMan</i> sendo degradada após a adição dos nucleotídeos por ação da <i>taq</i> -polimerase durante a reação de PCR em tempo real	33
Figura 5 - Curva de amplificação	34
Figura 6 - Perfil de amplificação das reações <i>monoplex</i> de PCR em tempo real	59
Figura 7 - Perfil de amplificação do <i>Multiplex 1</i> - <i>Salmonella enterica</i> / <i>Staphylococcus aureus</i> /IAC	60
Figura 8 - Perfil de amplificação do <i>Multiplex 2</i> - <i>E. coli O157:H7</i> / <i>Listeria monocytogenes</i> /IAC	62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APHA: *American Public Health Association*

APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

°BRIX: Sólidos sóluveis

BPF: Boas Práticas de Fabricação

CAMP Christie, Atkins e Munch-Peterson

CDC: Centro de Prevenção e Controle de Doenças

CPP: Contagem Padrão em Placas

Ct: *threshold cycle*

cDNA: DNA complementar

dNTPs: desoxirribonucleosídeos trifosfatados

Delta Rn: variação de fluorescência normalizada

DNA: *deoxiribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ensaio imuno-enzimático)

FDA: Food and Drug Administration

IAC: Controle Interno de Amplificação

IDF: *International Dairy Federation*

M: molar

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

mM: milimolar

ng: nanograma

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos gerais.....	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 O Leite.....	4
3.2 Alimento seguro	5
3.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	7
3.2.2 <i>Salmonella</i> sp.....	10
3.2.3 <i>Escherichia coli</i>	12
3.2.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	14
3.3 Produtos lácteos	18
3.3.1 O Doce de Leite	18
3.3.2 O Leite Condensado.....	22
3.3.3 O Queijo Minas Padrão.....	24
3.4 Métodos para caracterização microbiológica.....	26
3.4.1 Metodologia tradicional	27
3.4.2 Metodologias alternativas para detecção de patógenos.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Caracterização microbiológica dos derivados lácteos por metodologia clássica.....	38
4.1.1 Amostragem.....	38
4.1.2 Preparo das amostras.....	38
4.1.3 Contagem padrão em placas de mesófilos aeróbios.....	39
4.1.4 Contagem padrão em placas de bolores e leveduras	39
4.1.5 Coliformes a 30°C.....	39
4.1.6 Coliformes a 45°C.....	40
4.1.7 <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positiva e negativa.....	41
4.1.8 <i>Salmonella</i> sp.....	42
4.1.9 <i>Listeria monocytogenes</i>	43
4.2 Padronização de reações <i>multiplex</i> utilizando a técnica PCR em tempo real.....	44
4.2.1 Cepas.....	44
4.2.2 Extração de DNA.....	45

4.2.3 PCR em Tempo Real	46
4.2.4 Padronização da PCR monoplex em tempo real para <i>Salmonella enterica</i> var Thyphimurium, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> e IAC.....	46
4.2.5 Padronização da PCR multiplex em tempo real.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Perfil microbiológico dos derivados lácteos.....	49
5.1.1 Doce de leite	49
5.1.2 Leite condensado	52
5.1.3 Queijo Minas Padrão.....	55
5.2 Padronização de reações multiplex PCR em tempo real.....	58
6 CONCLUSÕES.....	64
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXO	90

1 INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) têm sido um grande problema de saúde pública em todo mundo e são relacionadas, principalmente, ao consumo de produtos de origem animal. Os surtos de DTA são reconhecidamente subnotificados, tornando-se impossível avaliar seu real impacto na saúde das populações e na economia, mesmo em países onde há um controle maior por parte dos órgãos de vigilância sanitária. Os estudos mais completos sobre DTA foram efetuados pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos (CDC, 2011). Segundo o CDC, as doenças transmitidas por alimentos são responsáveis atualmente pela maior parte dos surtos de diarreia em quase todos os países.

Durante o processo de produção, elaboração, transporte, armazenamento e distribuição, qualquer alimento está sujeito à contaminação por bactérias patogênicas. Alimentos de alto valor nutritivo como o leite e seus derivados são muito propícios ao desenvolvimento de diversos micro-organismos, sendo alguns deles, veículos de transmissão de importantes zoonoses e de patógenos responsáveis por DTA para o homem (FRAZIER, 1993). Grande parte dos surtos de DTA deve-se ao consumo do leite não pasteurizado e de seus derivados, especialmente queijos (ALTEKRUSE et al., 1998; DE BUYSER et al., 2001; PITT et al., 1999). Historicamente, com o advento da pasteurização, diminuíram os relatos de várias doenças transmitidas pelo leite e seus derivados, como brucelose, tuberculose, difteria, febre Q e uma série de gastroenterites.

Por outro lado, deve ser ressaltado que embora bastante efetivo no controle de doenças de origem alimentar, o tratamento térmico é insuficiente se não complementado com padrões elevados de higiene, desde a produção até o completo processamento (SHARP, 1981). Para se conhecer a existência de possíveis deficiências higiênicas, as quais implicariam em contaminações alimentares, voltam-se as atenções para grupos de micro-organismos, desde aqueles considerados indicadores, como também para os patogênicos que encontram no alimento um meio propício para o seu desenvolvimento e até mesmo a liberação de toxinas (FRANCO e ALMEIDA, 1992; PERESI *et al.*, 2001).

O doce de leite, o queijo Minas Padrão e o leite condensado são derivados lácteos de ampla aceitação comercial e bastante populares na alimentação da população na maioria das regiões do País, entretanto, estes dois últimos não possuem Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade, o que contribui para a falta de padronização desses produtos. Apesar de amplamente consumidos no Brasil e inclusive no exterior, como é o caso do leite

condensado e mais recentemente do doce de leite, poucos são os trabalhos que avaliaram a microbiota contaminante destes produtos.

A avaliação da qualidade dos derivados do leite é realizada para estimar a vida útil e também para verificar as condições higiênico-sanitárias dos produtos (SOUSA, 2005) sendo uma constante preocupação para técnicos e autoridades ligadas à área de saúde (LEITE JR et al., 2000; TIMM et al., 2003). Dentre os micro-organismos mais frequentemente encontrados em lácteos destaca-se os coliformes e os fungos, que dependendo da espécie podem ser deterioradores ou patogênicos como *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*, causadoras de infecções alimentares e os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* que são potencialmente toxigênicos (SALOTTI et al., 2006). Para a detecção destes patógenos, uma variedade de técnicas tem sido introduzida a fim de melhorar a sensibilidade e rapidez dos métodos rotineiros de análises, dentre elas, técnicas moleculares como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real. A PCR em tempo real é uma técnica de genética molecular que permite identificar e quantificar bactérias contaminantes em alimentos, fornecendo ao laboratório novas ferramentas de rotina com uma eficiência nunca antes atingida em termos de rapidez, sensibilidade e performance.

O presente estudo torna-se relevante devido à importância dos patógenos no contexto contemporâneo, nos casos de DTA, em particular, aos associados ao consumo de lácteos, a escassez de dados disponíveis na literatura mundial sobre a microbiota contaminante do doce de leite, leite condensado e queijo Minas Padrão e a crescente demanda por métodos de diagnóstico alternativos, que forneçam resultados cada vez mais rápidos e mais sensíveis.

Espera-se com os resultados obtidos, fornecer subsídios técnico-científicos às autoridades competentes. Estas informações permitirão às autoridades regulamentadoras embasarem-se em dados científicos a fim de estruturar regulamentos técnicos de identidade e qualidade específicos para o leite condensado e para o queijo Minas Padrão, já que estes produtos ainda não os possuem. A indústria se beneficiará com informações que auxiliarão nos programas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), que contribuirão para a prevenção e controle de contaminantes no processamento desses derivados lácteos, resultando em produtos mais seguros e de melhor qualidade para o consumidor. A incipiente literatura mundial se enriquecerá com os dados obtidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve por objetivos gerais a caracterização microbiológica de leite condensado, doce de leite e queijo Minas Padrão, utilizando metodologia clássica e a padronização de reações *multiplex* para detecção simultânea de culturas puras de *Salmonella enterica*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7, utilizando a técnica PCR em Tempo Real.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- Caracterizar, microbiologicamente, utilizando a metodologia clássica, leite condensado, doce de leite e queijo Minas Padrão, produzidos em diferentes Estados do Brasil;
- padronizar reações *monoplex* de PCR em tempo real para culturas puras de *S. enterica*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7;
- Padronizar duas reações *multiplex* utilizando a técnica PCR em tempo real para culturas puras de *S. enterica* e *S. aureus* (*multiplex* 1), *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 (*multiplex* 2).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Leite

Entende-se por leite natural, íntegro, não adulterado e sem colostro, o produto da glândula mamária de mamíferos, oriundo de ordenha completa e ininterrupta de fêmeas sadias e bem alimentadas (DAHMER, 2006; MORAES, 2005). Pela ótica química, Walstra et al. (2006) definem leite como uma emulsão líquida em que a fase contínua é formada de água e substâncias hidrossolúveis ao passo que a fase interna ou descontínua é formada, principalmente, de micelas de caseína e de glóbulos de gordura. Na visão biológica, o leite é definido por BAUMAN et al. (2006) como uma vasta gama de nutrientes, incluindo proteínas, carboidratos, partículas de gordura, água e íons, secretados pela glândula mamária.

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2011), o leite está entre os produtos mais importantes da agropecuária nacional, ficando à frente de produtos tradicionais como o café beneficiado e o arroz. Sob o aspecto de volume de leite produzido, o Brasil ocupa atualmente o quinto lugar no ranking dos países produtores (perdendo para EUA, Índia, China e Rússia) com um volume de 29.112.000 mil toneladas, no entanto, ocupa o décimo sétimo lugar em produtividade, com uma média de 1.309 ton/vaca/ordenha/ano. Do total dos 29,1 bilhões de litros produzidos em 2009, apenas 19,6 bilhões foram recebidos sob inspeção (EMBRAPA, 2011). Este dado evidencia a informalidade e justifica, em parte, a baixa produtividade e qualidade do leite.

A produção e a composição físico-química do leite variam segundo diversos fatores como individualidade, raça, alimentação, estágio de lactação, número de lactações, idade, temperatura ambiental, estação do ano, fatores fisiológicos, patológicos, persistência de lactação, tamanho do animal, porção da ordenha e intervalo de ordenhas (COSTA et al., 1992; WALDNER et al., 2005; WEISS et al., 2002). A composição química do leite determina o seu valor nutricional, seu sabor e aroma e apresenta em média 87% de água, 9% de sólidos não gordurosos (3,3% de proteína, 4,6% de lactose e 0,7% de cinzas) e 4,0% de gordura (WALSTRA et al., 2006).

Devido ao seu elevado teor de nutrientes, à disponibilidade de água e ao pH próximo da neutralidade, o leite constitui um substrato favorável ao desenvolvimento de micro-organismos oriundos de processos fermentativos, o que é desejável para a indústria de fermentados. Em contrapartida, também favorece o crescimento de micro-organismos patogênicos e deterioradores, caso não haja um conjunto de ações preventivas ao longo da

cadeia produtiva. Esse aspecto influencia o processamento e a qualidade dos derivados lácteos, com reflexos na sua vida-de-prateleira, na atividade econômica e na aceitação pelo consumidor (DAHMER, 2006).

Antes do advento da pasteurização, o leite fluido e seus derivados encontravam-se entre os principais veículos de doenças, como febre tifóide, difteria, escarlatina, tuberculose e brucelose. A pasteurização foi introduzida com o objetivo de destruir os micro-organismos patogênicos e reduzir o número dos deteriorantes. A maioria do leite consumido no mundo é tratado termicamente, porém a ocorrência de DTA pelo consumo de leite e derivados é comum. Isto se deve às seguintes razões: consumo de leite *in natura* não pasteurizado, consumo de queijos produzidos a partir de leite cru, não eliminação de toxinas de micro-organismos produzidas durante o armazenamento do leite cru pela pasteurização e contaminação do leite pós-pasteurização, pela presença de biofilmes em utensílios e equipamentos de laticínios (OLIVER et al, 2005). Apesar de a pasteurização ter contribuído para a redução da incidência das doenças transmissíveis pelo leite, as toxi-infecções alimentares continuam sendo preocupantes para os consumidores, para as indústrias e para a saúde pública (BOOR, 2001; DONNELLY, 1990).

3.2 Alimento seguro

A garantia da segurança microbiológica de produtos de origem animal baseia-se na prevenção de transferência de agentes patogênicos (ou de suas toxinas) e de resíduos de drogas químicas, empregadas no manejo dos rebanhos, para os alimentos (SANTOS, 2008).

A importância da segurança microbiológica dos alimentos é reconhecida pelos legisladores da maioria dos países e por instituições como a Organização Mundial de Saúde (OMS), *Food Agriculture Organization* (FAO), *Food and Drug Administration* (FDA), *International Dairy Federation* (IDF/FIL) e a Organização Mundial do Comércio (FAO, 2011; HORTON, 2001; WHO/OMS, 1999). O desenvolvimento econômico e a globalização do mercado mundial, as alterações nos hábitos alimentares, com a crescente utilização de alimentos industrializados ou preparados fora de casa, alteraram o perfil epidemiológico dessas doenças, expondo a população a vários tipos de contaminantes. Essa situação é diferente da existente até as primeiras décadas do século passado, quando os micro-organismos causadores de doenças em animais de produção, como a brucelose e a tuberculose, eram os principais riscos à saúde dos consumidores de produtos de origem animal (OPAS, 2001). Nos últimos anos, ocorreu um grande número de surtos de toxi-

infecções alimentares, muitos deles envolvendo mais de um país e, alguns, mais de um continente. Estes surtos prejudicam os programas de saúde pública, que, em grande parte, já são deficitários e causam importante redução da atividade econômica (HORTON, 2001; WHO/OMS, 1999). O *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC) estima que a cada ano, um em cada seis americanos, ou seja, 48 milhões de pessoas, fiquem doentes, 128 mil sejam hospitalizados e 3 mil morram de DTA (CDC, 2011). As estimativas apontam que os custos com DTA chegam a 152 bilhões de dólares ao ano (PRODUCE SAFETY PROJECT, 2010). Dentre os agentes etiológicos mais onerosos aos cofres públicos, encontram-se a *S. enterocolitica*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. aureus*. Dados mostram que a grande maioria das doenças transmitidas por alimentos são causadas por patógenos conhecidos (Tabela 1).

Tabela 1 - Cinco principais patógenos que causam doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos.

Patógeno	Estimativa anual (N)	Intervalo de Confiança de 90%	%
Norovirus	5.461,73	3.227,08-8.309,48	58
<i>Salmonella</i>	1.027,56	644.786-1.679,67	11
<i>Clostridium perfringens</i>	965.958	192.316-2.483,31	10
<i>Campylobacter spp.</i>	845.024	337.031-1.611,08	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	241.148	72.341-529.417	3
Subtotal			91

Legenda: N = número de doenças. Fonte: *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC, 2011).

No entanto, o sistema de vigilância do CDC *FoodNet* mostrou uma redução de 20% na última década em doenças causadas por patógenos. O CDC acredita que esta tendência de queda se deve em parte aos esforços de regulamentação, fiscalização e da indústria para melhorar a segurança alimentar.

No Brasil, no período de 1999-2010, foram notificados 6.971 surtos por DTA, nos quais 1,8 milhão de pessoas foram expostas, com o acometimento de 133.954 pessoas e 88 óbitos registrados. Dos agentes etiológicos identificados, *Salmonella sp.* e *Staphylococcus spp.* foram os mais comuns (BRASIL, 2011). Uma vez que no país há um sério problema de subnotificação de DTA, esses números são, certamente, bastante superiores.

Em virtude da importância de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella sp.* e *S. aureus* como causadores de DTA e da relevância destas no contexto contemporâneo, a seguir serão relatados dados da literatura científica relacionados à importância destes patógenos como causadores de toxi-infecções alimentares.

3.2.1 *Staphylococcus aureus*

Um dos tipos mais comuns de doenças de origem alimentar em todo o mundo é a toxi-infecção causada por alimentos contendo enterotoxinas de *S. aureus*, doença de curso rápido, em que indivíduos afetados geralmente não necessitam de atendimento médico e a maioria dos casos não é notificada (RODRIGUES et al., 2004). O início dos sintomas da enfermidade ocorre, em média, de duas a quatro horas após a ingestão do alimento contaminado, sendo a doença normalmente autolimitante e, geralmente, os sintomas desaparecem de dois a três dias após o seu início (FORSYTHE, 2002; FRANCO e LANDGRAF, 2004; LE LOIR et al., 2003; SU e WONG, 1997). Os principais sintomas desta toxi-infecção são vômitos e diarreia, podendo ocorrer também náuseas, cólicas abdominais e sudorese. Estes sintomas, que têm curta duração, variam com o grau de susceptibilidade do indivíduo, com a concentração da enterotoxina no alimento e a quantidade ingerida (BANNERMAN, 2003; FORSYTHE, 2002; RODRIGUES et al., 2004).

O gênero *Staphylococcus* apresenta 35 espécies e 17 subespécies, sendo *S. aureus* a espécie típica e o principal patógeno do gênero (BANNERMAN, 2003). É considerada uma das mais resistentes bactérias patogênicas não formadoras de esporos, inclusive no que diz respeito à resistência a antimicrobianos (BARROW e FELTHAM, 1993; JABLONSKI e BOHACH, 1997; GERMANO e GERMANO, 2003; RAPINI et al., 2004). As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são tolerantes a concentrações de 10% a 20% de NaCl e também a nitratos, permitindo assim seu desenvolvimento em alimentos curados (CORBIA et al., 2000; MURRAY et al., 1998). *S. aureus* é uma bactéria mesófila, multiplica-se entre 7°C e 48°C, sendo 37°C a temperatura ótima de crescimento. As faixas de pH e atividade de água (A_w) suportadas pela bactéria e sua toxina são amplas, sendo o pH ótimo de 7 a 7,5 e é o agente patogênico bacteriano mais resistente com relação a A_w diminuída (ADAMS e MOTARJEMI, 2002).

A toxi-infecção alimentar é causada pela ingestão da toxina previamente formada no alimento contendo *S. aureus* (CARMO et al., 1995; CARMO et al., 1996; CARMO, 1997; FORSYTHE, 2002; JABLONSKI e BOHACH, 1997; SANT'ANA e AZEREDO, 2005; TRABULSI et al., 2002). Em condições favoráveis, o micro-organismo multiplica-se no alimento, produzindo as enterotoxinas sem que seja alterada significativamente a cor, o aroma e o sabor (SANTOS, 1997). Suas enterotoxinas são produzidas entre 10°C e 48°C; contudo, a faixa de 40°C a 45°C é considerada ótima para sua síntese (BERGDOLL, 1989). Em geral, os

casos de toxi-infecção alimentar são provocados por alimentos que permaneceram nesse intervalo de temperatura por tempo variável. Em condições ótimas, as enterotoxinas são detectadas em quatro a seis horas de incubação (FRANCO e LANDGRAF, 2004). São conhecidos 19 tipos de enterotoxinas estafilocócicas (SE). Existem cinco tipos clássicos principais, SEA, SEB, SEC, SED, SEE, e novas SE ou superantígenos semelhantes a SE, como SEG a SEU (CHIANG et al., 2008). Essas toxinas são proteínas de baixa massa molecular, altamente termoestáveis e resistentes à cocção ou a enzimas proteolíticas, permanecem ativas nos alimentos tornando-se um risco em potencial para a saúde do consumidor e um problema para a saúde pública (CARMO, 1997; CARMO et al., 2002; FORSYTHE, 2002; RAPINI et al., 2005).

Lamaita et al. (2005) analisaram 80 amostras de leite cru refrigerado a 4°C e estocado por 48 horas em tanques resfriadores de propriedades rurais do Estado de Minas Gerais quanto à contagem e identificação de *Staphylococcus* spp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas (SE) e da toxina do choque tóxico (TSST-1). Identificaram-se *S. aureus* e a produção de SEA, SEB, SEC, SED e de TSST-1, sendo que dos *Staphylococcus* spp. enterotoxigênicos, 24,6% eram coagulase positiva e 41,3%, coagulase negativa. Em um estudo realizado por Arcuri et al. (2010), de 291 isolados de *S. aureus* provenientes de vaca com mastite, leite de tanque a granel e queijo Minas Frescal no Brasil, os genes para produção de SE foram observados em 37,5% de todas as cepas testadas, mas, estes genes, assim como a maior diversidade de toxinas, foram mais prevalentes em cepas isoladas de queijo Minas Frescal (51 dos 70 isolados) e leite do tanque (41 dos 96 isolados) do que em cepas provenientes do leite de vacas com mastite (17 dos 125 isolados).

Pereira e colaboradores (1991) demonstraram que em creme de confeitaria e presunto cozido, 10^3 células de *Staphylococcus aureus.g*⁻¹ foram suficientes para produção da enterotoxina D, após 24 h de incubação à 37°C e, a produção da toxina, estava correlacionada à produção da enzima coagulase. Apesar de muitos autores afirmarem que somente as espécies de *Staphylococcus* produtoras da enzima coagulase sejam capazes de produzir enterotoxinas, atualmente, acredita-se que outras espécies de *Staphylococcus* também sejam capazes de produzir enterotoxinas, tanto as espécies coagulase positivas quanto as espécies coagulase negativas (ANUNCIACÃO et al., 1994; CARMO et al., 2002; LAMAITA et al., 2005; ORDEN et al., 1992; RAPINI et al., 2005). Veras et al. (2008) desenvolveram um importante trabalho analisando *S. aureus* coagulase negativos isolados de produtos lácteos. Estes autores observaram que, entre oito isolados de *S. aureus* coagulase negativos analisados, cinco apresentaram genes que codificam enterotoxinas. Pereira e outros (2001) cita dados de

literatura que relatam, de maneira exígua, mas consistente, três episódios de intoxicação alimentar nos quais *Staphylococcus* não produtores de coagulase foram evidenciados. O primeiro teve lugar no Japão com a participação de 40 estudantes, onde o agente causal foi igualmente detectado nas fezes e em superfícies de pratos utilizados em lanche do hotel (OMORI e KATO, 1959). O segundo, nos Estados Unidos, no qual 145 comensais manifestaram a doença, sendo que *S. epidermidis* produtor de enterotoxinas estafilocócicas foi detectado na carne consumida e também em lesões nas mãos de um manipulador, caracterizando detecção de enterotoxina sintetizada a partir de espécie não produtora de coagulase (BRECKINRINDGE e BERGDOLL, 1971). Já o terceiro surto ocorreu no Brasil em 1999 e foi associado ao consumo de leite cru (CARMO et al., 2002) do qual não se conseguiu isolar nenhuma espécie coagulase positiva, apenas *Staphylococcus* coagulase negativa, produtores de enterotoxinas foram isolados e em contagens superiores a 10^8 UFC/mL. Estudos posteriores concluíram contaminação com *Staphylococcus epidermidis* (VERAS et al., 2003). Além destes três surtos, há relato de um caso de intoxicação estafilocócica associada ao consumo de frango assado, do qual fora isolada uma espécie coagulase negativa produtora de enterotoxina nos EUA (CRASS e BERGDOLL, 1986).

Carmo et al. (2002) descreveram dois surtos de toxi-infecção alimentar por *Staphylococcus* ocorridos em duas cidades do interior de Minas Gerais: Manhuaçu e Passa Quatro, em 1999. Nos dois surtos, 378 indivíduos adoeceram por consumirem queijo Minas Frescal e leite cru, respectivamente. As análises dos queijos consumidos no primeiro surto demonstraram que *S. aureus* esteve presente em quantidades de $2,4 \times 10^3$ a $2,0 \times 10^8$ UFC/g e produziu as enterotoxinas SEA, SEB e SEC. Já a análise do leite cru indicou a presença de *Staphylococcus* coagulase negativa em quantidades que excederam $2,0 \times 10^8$ UFC/mL e a produção de enterotoxinas SEC e SED. Vários estudos demonstraram que o queijo Minas Frescal e outros produtos lácteos estiveram envolvidos em muitos casos esporádicos e surtos de toxi-infecção alimentar por *S. aureus* no Brasil e em outros países (ADESIYUM et al., 1998; ALMEIDA FILHO e NADER FILHO, 2000; ANUNCIACÃO et al., 1994; ASATO et al., 2003; CARMO e BERGDOLL, 1990; CARMO et al., 2002; SILVA e CASTRO, 1995; VERAS et al., 2003). Outros autores também relataram a presença de *S. aureus* em leite e derivados, inclusive em produtos pasteurizados, e contestam sobre a qualidade desses produtos no Brasil (CÂMARA et al., 2002; CARDOSO e ARAÚJO, 2004; LAMAITA et al., 2005; MACEDO e PFLANZER JÚNIOR, 2005; SANTANA et al., 2006).

Foram investigados oito surtos, na região de São José do Rio Preto, São Paulo, no período de dezembro de 2001 a abril de 2003. Desses, quatro (50%) foram confirmados

laboratorialmente e *S. aureus* foi o agente envolvido. Os produtos de confeitaria, como doces e salgados, foram os alimentos implicados. Segundo inquéritos epidemiológicos, o número total de indivíduos afetados foi 52, sendo 13 a média de pessoas por surto e de hospitalizados sete (13,5%). Sabe-se que nos serviços de saúde do Brasil existem poucos registros epidemiológicos a respeito de doenças veiculadas por alimentos. No entanto, supõe-se que as intoxicações estafilocócicas sejam muito comuns no país, visto a precariedade de saneamento básico, bem como a falta de noções básicas de higiene no ciclo produtivo dos alimentos, além da deficiência nas notificações de doenças (FERNANDEZ, 2003; SANTANA et al., 2006). Considerando o número de casos dos surtos notificados de doenças transmitidas por alimentos no Estado de São Paulo em 2000, *S. aureus* também teve destaque por tipo específico de bactéria, tendo sido responsável por 1.133 casos de toxi-infecções notificados (SILVA JÚNIOR, 2005).

Cordeiro et al. (2002) avaliaram amostras de leite pasteurizado comercializadas no Estado do Rio de Janeiro e encontraram 83,4% de amostras positivas para *S. aureus*. Este patógeno também foi isolado em 10% das amostras de leite pasteurizado comercializado na região metropolitana de Curitiba, Paraná (MACEDO e PFLANZER JÚNIOR, 2005).

O estudo dessas enfermidades é de extrema importância, gerando subsídios aos órgãos de saúde pública para tomada de medidas de prevenção e controle dos riscos relacionados às práticas de fabricação e conservação dos alimentos, visando à redução de ocorrência de DTA (PERESI et al., 2004). A ausência de *S. aureus* e nem mesmo a sua presença em pequeno número são garantia de que o alimento seja seguro, pois, condições desfavoráveis para a sobrevivência desse micro-organismo podem resultar em uma diminuição de sua população ou morte da célula microbiana, mas, se quantidades suficientes de enterotoxinas já tiverem sido formadas, elas permanecem para induzir um quadro de intoxicação alimentar estafilocócica (MICHELIN, 2006).

3.2.2 *Salmonella* sp.

Salmonella sp. é ubíqua no ambiente e presente também em indústrias processadoras de carne, sobretudo de suíno e aves, uma vez que essas espécies consistem nos principais reservatórios desta bactéria, pois são portadores assintomáticos. Esta bactéria habita o trato gastrointestinal de todos os mamíferos de sangue quente, inclusive a espécie humana. Produtos crus de origem animal, assim como outros alimentos, como frutas e vegetais, particularmente aqueles susceptíveis à contaminação fecal, também são importantes

veiculadores de *Salmonella*. Esta bactéria é incapaz de sobreviver à pasteurização; assim, os produtos lácteos se contaminam como resultado de contaminação pós-pasteurização (BRADSHAW et al., 1987). Dessa forma, evitar o consumo de produtos de origem animal crus é importante para prevenir a contaminação por *Salmonella* (WEDDESKOPP et al., 2001).

Segundo estimativas, *Salmonella* é a principal causa de hospitalização por DTA de origem bacteriana nos EUA, sendo responsável por 19.000 hospitalizações e 378 óbitos, a cada ano (CDC, 2011). Jayarao e Henning (2001) pesquisaram a presença de *Salmonella* em 131 amostras de leite cru nos Estados Unidos. Seus resultados demonstraram que oito amostras foram positivas para este patógeno.

Vários surtos pelo consumo de produtos lácteos pasteurizados contaminados com *Salmonella sp.* já foram relatados (JOHNSON et al., 1990). Um surto importante envolvendo leite pasteurizado ocorreu em Chicago, EUA, em 1985. Neste surto, mais de 23.000 casos foram confirmados laboratorialmente e 10% dos pacientes desenvolveram artrite como seqüela da salmonelose (DONNELLY, 1990).

De Buyser et al. (2001) realizaram um levantamento sobre as implicações do leite e derivados em surtos de toxi-infecções alimentares na França e em mais sete países (Canadá, Dinamarca, Escócia, EUA, Holanda, Suécia, Inglaterra e País de Gales). Neste estudo, os autores consideraram quatro patógenos: *Salmonella sp.*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli*. Eles observaram que o leite e derivados são responsáveis por um a cinco por cento do total de surtos causados por bactérias. De um total de 60 surtos estudados, *Salmonella sp.* foi responsável por 29 surtos, sendo o principal patógeno associado a DTA.

Nos EUA, de 1960 a 2000, 12 surtos de DTA foram associados ao consumo de leite pasteurizado (OLSEN et al., 2004). Estes autores também relataram surto de toxi-infecção alimentar pelo consumo de leite pasteurizado, no estado da Pensilvânia, EUA, tendo como causa *Salmonella enterica ssp. enterica* sorotipo Typhimurium, um dos sorotipos mais comuns de *Salmonella*. Neste surto, 93 pessoas apresentaram sintomas de salmonelose e foram constatadas como portadores da bactéria. O leite consumido pelos acometidos foi proveniente de um laticínio que beneficiava leite cru de 59 fazendas do estado da Pensilvânia e foi contaminado após a pasteurização.

A emergência de *Salmonella enterica* var. Typhimurium DT 104 tem preocupado os órgãos responsáveis pela saúde humana e animal, devido a sua resistência cromossomal para, pelo menos, cinco antimicrobianos: ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina. Dois surtos envolvendo *Salmonella enterica* var. Typhimurium DT 104 e

associados ao consumo de queijo produzido a partir de leite cru, na Califórnia, EUA, foram relatados por Cody et al. (1999). Estes autores observaram que em um dos surtos, veiculados pelo consumo de queijo tipo Mexicano, o sorotipo Typhimurium DT 104 foi isolado dos pacientes. Durante o outro surto, a mesma bactéria foi isolada de 79 pessoas que consumiram queijo Mexicano adquirido de vendedores ambulantes ou que consumiram leite cru. Villar et al. (1999) também estudaram um surto de DTA envolvendo *S. enterica* var. Typhimurium DT 104 pelo consumo de queijo produzido a partir de leite cru, no estado de Washington, EUA. O surto ocorreu em 1997, havendo a confirmação de 54 casos de infecção por este patógeno.

Apesar de *Salmonella* ser um importante patógeno causador de toxi-infecções alimentares no Brasil e no mundo, vários pesquisadores brasileiros investigaram esta bactéria em leite e derivados não a encontraram (ALMEIDA e FRANCO, 2003; BARROS et al., 2004; BRICIO et al., 2005; BRIGIDO et al., 2004; GUSMÃO et al., 2005; MACEDO e PFLANZER JÚNIOR, 2005; PEREIRA et al., 1999; TINOCO et al., 2002). Entretanto, em outro estudo, a presença de *Salmonella* sp. foi identificada. Peresi et al. (2001) analisaram amostras de queijos Minas Frescal comercializados em feiras livres e supermercados da cidade de São José do Rio Preto, São Paulo e identificaram *Salmonella* sp. em duas amostras produzidas artesanalmente.

É bastante claro que a ocorrência de salmonelose na cadeia de alimentos em todo o mundo é corrente e sua repercussão em saúde pública consiste em uma causa importante. Ao menos que mudanças estruturais e higiênico-sanitárias significativas nas práticas agropecuárias sejam implementadas, a ocorrência de toxi-infecções alimentares tendo como causa *Salmonella* deve continuar.

3.2.3 *Escherichia coli*

E. coli, assim como outras enterobactérias, apresenta numerosos sorotipos, os quais estão associados a infecções no homem e em outros animais (BARROW e FELTHAM, 1993). Sua membrana externa é constituída por lipopolissacarídeos, os quais são capazes de causar choques septicêmicos, coagulação intravascular disseminada e morte (KUNTZ e KUNTZ, 1999).

A classificação dentro dos grupos específicos baseia-se nos mecanismos de patogenicidade e virulência da cepa, nas síndromes clínicas e nos distintos sorogrupos O:H. Estes grupos incluem; cepas enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), difuso-aderentes (DAEC), enteroagregativas (EAggEC) e

enterohemorrágicas (EHEC) (DOYLE, et al., 1997). Os sorogrupos mais importantes dentre os causadores de diarreia sempre foram EPEC e ETEC, porém, nos últimos anos, EHEC têm ganhado maior interesse devido à ocorrência de numerosos casos de síndromes clínicas associadas principalmente ao consumo de carne, leite e derivados (BOTTERO et al., 2004). Os sorogrupos mais importantes de EHEC são O26, O111 e O157, sendo o O157:H7 o mais relevante sorotipo em surtos de toxi-infecções alimentares (BLANCO et al., 1996; BOPP et al., 2003). Além da transmissão por meio dos alimentos, *E. coli* O157:H7 também pode ser transmitida por contato direto com pessoas infectadas, sobretudo quando há condições inadequadas de higiene (LIOR, 1993). A dose mínima infectante, 2,0 UFC de *E. coli* O157:H7 em 25 gramas de alimento, é muito baixa quando comparada a outros patógenos (BLANCO et al., 1996).

A patogenicidade de *E. coli* O157:H7 está relacionada a três fatores de virulência: produção de enterotoxinas semelhantes à de *Shigella* (SLT I e II), produção de hemolisina e expressão de adesinas específicas com as quais a bactéria coloniza o epitélio intestinal. Esta bactéria pode produzir uma ou as duas enterotoxinas. A produção de SLT II parece estar associada ao desenvolvimento da síndrome hemolítica urêmica. Estas toxinas são citotóxicas para as células do cólon e íleo (ARMSTRONG et al., 1996).

A *E. coli* O157:H7 foi reconhecida na década de 1990 como um importante patógeno alimentar e como um dos principais problemas de saúde pública na América do Norte e na Europa (COIA, 1998). Os fatores determinantes para o surgimento desta bactéria como importante patógeno incluem mudanças nos hábitos de vida da população, aumento do consumo de produtos industrializados e mudanças na indústria de alimentos (ARMSTRONG et al., 1996). Além destes, mudanças no manejo dos animais, tal como a irrigação de pastagem com esterco, propicia a criação de ambientes nos quais *E. coli* O157:H7 consegue persistir (HANCOCK et al., 1994). Estudos revelam que este sorotipo apresenta uma tolerância incomum a alguns estresses ambientais, como pH e umidade baixos (ARNOLD e KASPAR, 1995; GLASS et al., 1992).

Produtos de origem animal, tais como carne mal passada, leite cru, leite pasteurizado e iogurte têm sido associados a surtos de toxi-infecções alimentares causadas por *E. coli* O157:H7 (BETTS, 2000; BOYCE et al., 1995; DOYLE, 1991; GOVARIS et al., 2002; GRIFFIN e TAUXE, 1991; MECHIE et al., 1997; MORGAN et al., 1993; UPTON e COIA, 1994). O iogurte tem sido considerado um alimento seguro, porém, já foi envolvido em infecção fatal por *E. coli* O157:H7 no Noroeste da Inglaterra (MORGAN et al., 1993). Massa et al. (1997) avaliaram a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em iogurtes durante o seu

processamento e armazenamento. Esses pesquisadores observaram que a contagem bacteriana diminuiu de 7,08 para 5,32 log UFC mL⁻¹, após sete dias de estocagem a 4°C. Outros estudos também têm demonstrado a capacidade de *E. coli* O157:H7 sobreviver por longos períodos sob baixas temperaturas em pH neutro e ácido (CAMPBELL et al., 2004). Govaris et al. (2002) reportaram a sobrevivência deste patógeno durante 30 dias a 2°C em soro de queijo.

Wang et al. (1997), avaliando o crescimento e a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em leite cru e pasteurizado, observaram que nas temperaturas de 8 e 15°C houve maior taxa de crescimento desta bactéria, chegando a contagens de 10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC) por mL. De acordo com esses autores, armazenar o leite a temperaturas inferiores a 5°C é recomendado para prevenir o crescimento deste patógeno.

Oksüz et al. (2004), investigando amostras de leite cru e de queijos produzidos com leite cru, na Turquia, encontraram 1% de amostras de leite cru e 4% de amostras de queijos positivas para *E. coli* O157. Estes resultados demonstram que queijos produzidos a partir de leite cru têm potencial para causar infecções por *E. coli* O157. Esta bactéria, bem como outros sorogrupos de *E. coli* (STEC), também já foram isolados de rebanhos leiteiros no Brasil, nos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, havendo, dessa forma, a possibilidade de sua presença no leite cru (FARAH et al., 2003; GONZALEZ, et al., 2001; MOREIRA et al., 2003; PRADO et al., 2001).

Para proteger a imagem dos produtos lácteos como alimentos saudáveis, a indústria de laticínios considera, desde o final do século XX, *E. coli* O157:H7 tão importante quanto outros patógenos, como *Salmonella* e *S. aureus* (DUNCAN e HACKNEY, 1994). A adoção de boas práticas agropecuárias e de fabricação durante a manufatura de produtos de origem animal e o cozimento adequado dos alimentos antes do consumo são importantes medidas de controle para prevenir infecções por *E. coli* O157:H7 (DOYLE, 1991). O controle e a prevenção da presença de *E. coli* O157:H7 e de outros patógenos em alimentos deve basear-se em um profundo entendimento da epidemiologia do patógeno e no consumo preferencialmente de alimentos tratados termicamente (MEAD e GRIFFIN, 1998).

3.2.4 *Listeria monocytogenes*

No gênero *Listeria*, atualmente, seis espécies são reconhecidas: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* e *L. murrayi*. As espécies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* são as únicas associadas com patogenicidade, mas

somente *L. monocytogenes* é consistentemente patogênica para humanos e animais. *L. ivanovii* causa doenças predominantemente em ovinos e raramente no homem (JAY et al., 2005); *L. seeligeri* somente foi diagnosticada uma vez como causa de meningite em um adulto não imunocomprometido (IFT, 2004). O meio científico foi despertado para o perigo da listeriose durante a década de 80 quando uma série de surtos ocorreu na América do Norte e Europa (FRANCO e LANDGRAF, 1996; SCHLECH, 1983).

Apesar de 13 sorotipos de *L. monocytogenes* já terem sido descritos, apenas três (1/2a, 1/2b e 4b) causam a maioria dos casos clínicos no homem e nos animais (JAY et al., 2005; TAPPERO et al., 1995). *L. monocytogenes* pode tolerar várias condições ambientais adversas, tais como valores de pH entre 4,1 e 9,6 e concentrações de até 30% de cloreto de sódio. É ubíqua na natureza, sendo encontrada em alimentos *in natura* e processados e no ambiente de processamento dos alimentos, como um biofilme, além ser amplamente reconhecida como agente de toxi-infecção alimentar (DOYLE, 1988; MURIAMA, 1996). Devido à resistência às condições ambientais desfavoráveis e à gravidade das infecções causadas, *L. monocytogenes* é considerada um dos patógenos de infecção de origem alimentar mais importantes na atualidade (ALMEIDA e ALMEIDA, 2003).

Na espécie humana, a listeriose apresenta-se sob as formas clínicas graves, como septicemia e meningite. Mulheres grávidas são particularmente susceptíveis à infecção, podendo ocorrer aborto espontâneo ou originar natimortos. A listeriose é mais comum em neonatos, idosos e pacientes imunocomprometidos. A infecção é rara, mas a taxa de mortalidade varia de 20 a 30% e pode chegar a 75% nos grupos de risco (GELLIN e BROOME, 1989; LINNAN et al., 1984; SCHUCHAT et al., 1991). Após a replicação no trato gastrointestinal do hospedeiro, *L. monocytogenes* difunde-se diretamente nas células adjacentes por meio de um mecanismo de motilidade baseado na polimerização da actina da célula do hospedeiro. Os fatores de virulência envolvidos na aderência, entrada, sobrevivência intracelular, multiplicação e difusão de célula a célula têm sido caracterizados. Embora considerável progresso tenha sido alcançado nos estudos sobre os genes e seus produtos responsáveis pela virulência de *L. monocytogenes*, diversos questionamentos em relação a estes mecanismos ainda permanecem não elucidados (ALMEIDA e ALMEIDA, 2003). Trabalhos sugerem que a quantidade de *L. monocytogenes* em alimento contaminado capaz de causar surtos e casos esporádicos de listeriose é superior a 10^2 UFC/g; contudo doses infectantes inferiores a este valor não podem ser descartadas (RO COURT e COSSART, 1997).

Estudos realizados no Canadá e EUA demonstraram que *L. monocytogenes* pode ser encontrada no leite cru em taxas que variam de 1,3 a 5,4% (FARBER et al., 1988a; HASSAN et al., 2001; LIEWEN e PLANTZ, 1988; LOVETT et al., 1987; SLADE e COLLINS-THOMPSON, 1988). A sobrevivência e a proliferação de *Listeria* spp. em alimentos, sobretudo em produtos lácteos, crus e pasteurizados, são consideradas bastante elevadas. Há relatos da sobrevivência, em produtos lácteos, de *L. innocua* (não patogênica) e *L. monocytogenes* (patogênica) por mais de 178 e 140 dias, respectivamente (ERKMEN, 1995; ÖZTÜRKOGTU et al., 2006).

A *Listeria* é um importante patógeno no contexto dos produtos lácteos por sua habilidade de crescer e se multiplicar em temperaturas de refrigeração, sendo caracterizada como psicotrófica (DONNELLY, 1990). Rosenow e Marth (1987) analisaram o crescimento de *L. monocytogenes* em leite integral, leite desnatado, leite achocolatado e creme de leite armazenados em várias temperaturas e observaram que este patógeno é capaz de se proliferar em temperaturas que variam de 4 a 35°C. O menor tempo de geração foi observado na temperatura de 35°C; porém, em todas as temperaturas avaliadas (4, 8, 13, 21 e 35°C) houve crescimento da população de *L. monocytogenes* alcançando 10^7 UFC/mL, valor este superior ao mínimo considerado capaz de causar toxi-infecção alimentar, que é de 10^3 UFC/mL.

Jayarao e Henning (2001), ao avaliarem 131 amostras de leite cru nos EUA, pesquisaram a presença de vários patógenos no leite, entre eles *L. monocytogenes*. Seus resultados demonstraram que seis amostras apresentaram-se positivas para este patógeno. Sendo que contaminação fecal pode ser a fonte da presença de *L. monocytogenes* no leite.

Alguns surtos envolvendo *L. monocytogenes* foram relatados e vários alimentos foram incriminados, como leite cru e pasteurizado, queijos, manteiga, carne crua e cozida, patês, vegetais, peixes e pratos prontos (BOGGS et al., 2001; BULA et al., 1995; DALTON et al., 1997; FLEMING et al., 1985; GOULET et al., 1995; HURD et al., 2000; JAMES et al., 1985; JENSEN et al., 1994; LINNAN et al., 1988; LYYTIKÄINEN et al., 2000; MCLAUCHLIN et al., 1991; MCLAUCHLIN, 1996; SCHLECH et al., 1983).

Dois surtos importantes ocorreram nos EUA na década de 1980. Um deles ocorreu no Estado de Massachusetts, em 1983, no qual leite pasteurizado foi considerado como veículo (FLEMING et al., 1985), e o outro, na Califórnia, em 1985, no qual queijo estilo Mexicano foi o veículo. Este surto envolveu 148 casos e 48 mortes e, provavelmente, foi o alerta principal para o papel do alimento como disseminador de listeriose (JAMES et al., 1985). No surto de Massachusetts, 49 pacientes adquiriram listeriose e 14 morreram. No caso específico do surto de Massachusetts, não foi encontrada nenhuma evidência de falha na pasteurização

do leite na indústria. Levantou-se a hipótese de sobrevivência do micro-organismo à pasteurização (BRADSHAW et al., 1985). Entretanto, vários estudos já comprovaram que a pasteurização rápida do leite, 72 a 75°C por 15 a 20 segundos é adequada para destruir este patógeno no leite integral (BRADSAHW et al., 1985; FARBER et al., 1988b; MACKEY E BRATCHELL, 1989). O importante trabalho de Bradshaw et al. (1985), que estudou a termorresistência desta bactéria durante dois anos, demonstrou que 71,7°C por 15 segundos foi o binômio tempo/temperatura suficiente para inativar *L. monocytogenes* em leite cru contaminado com 15 log deste micro-organismo.

A presença de *L. monocytogenes* em leite pasteurizado foi também observada por Ahmed e Hussein (2005). Estes pesquisadores analisaram leite e creme de leite pasteurizados comercializados no Egito e detectaram este patógeno em 4% das amostras de leite pasteurizado. Nenhuma amostra de creme de leite apresentou *L. monocytogenes*.

Allmann et al. (1995), aplicando a técnica de PCR, investigaram a presença de *L. monocytogenes* em leite cru, manteiga, queijo e iogurte produzidos a partir de leite cru. Esses autores observaram que a taxa de contaminação dos produtos lácteos por este micro-organismo foi de 13%.

De acordo com Nichols et al. (1997), 16 (1%) de um total de 1.437 amostras de queijos frescos comercializados na Inglaterra e País de Gales foram positivas para *L. monocytogenes*. *Listeria* spp. também foi isolada de 51 (4%) amostras.

Kells e Gilmour (2004) monitoraram, durante um ano, dois laticínios, na Irlanda. A incidência de *Listeria* nos equipamentos foi de 18,8% (6,3% *L. monocytogenes*), no ambiente foi de 54,7% (40,6% *L. monocytogenes*) e no leite cru de 44,4% (22,2% *L. monocytogenes*).

Vários estudos demonstram resultado positivo para *Listeria monocytogenes* em queijos Minas Frescal no Brasil (BRIGIDO et al., 2004; CARVALHO, 2003; SILVA et al., 2003 e 2004). No estudo de Silva et al. (1998), os quais avaliaram amostras de vários tipos de queijos comercializados no mercado varejista do Rio de Janeiro, quanto à presença de *Listeria* spp, observou-se que, das 103 amostras analisadas, 11 (10,68%) estavam contaminadas por *L. monocytogenes*. A ocorrência de *Listeria* spp. em pontos críticos de controle e no ambiente de processamento de queijo tipo Minas Frescal em dois laticínios na Bahia foi determinada por Silva et al. (2003). Neste estudo os autores observaram que, na fabricação deste tipo de queijo, os pontos críticos de controle incluem a recepção do leite cru, a pasteurização, a coagulação e a estocagem do produto acabado. Em uma das fábricas, *L. monocytogenes* foi isolada de amostras de leite cru (16,7%) e de amostras do chão da sala de refrigeração dos queijos (14,3%). Em Fortaleza, *L. monocytogenes* foi detectada em leite cru, fresco e

refrigerado, leite pasteurizado (após 60 horas de estocagem a 4°C), tanque de recepção do leite cru, caixas plásticas de transporte de leite e em drenos e pisos de uma indústria beneficiadora de leite tipo C (FIGUEIREDO, 2000). De acordo com os resultados, verificou-se que, das 260 amostras analisadas, espécies do gênero *Listeria* foram isoladas em 39 amostras (15%), sendo 19 (7,3%) amostras positivas para *L. monocytogenes*. Em Juiz de Fora, Brito et al. (2008) avaliaram uma indústria processadora de queijo Minas Frescal e isolaram *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a, de mesmo perfil genético, em queijos, equipamentos e utensílios. Os autores concluíram que o refrigerador de estocagem era a fonte de contaminação dos queijos.

Na indústria de laticínios, as principais vias de introdução desse patógeno são o leite cru, os utensílios e os equipamentos contaminados, o solo carregado pelas botas e roupas dos trabalhadores, o ar, o sistema de ventilação, a água empoçada e/ou condensada e os carros de transporte, além da possibilidade dessa ser carregada por operários ou visitantes doentes (SWAMINATHAN, 2001).

Vale ressaltar que algumas cepas de *L. monocytogenes* podem permanecer no ambiente de processamento durante meses ou anos. Diante do exposto percebe-se que é necessário estabelecer procedimentos de controle em diferentes pontos na cadeia de produção de alimentos, aumentar a amostragem durante o processamento e adotar metodologias que proporcionem resultados cada vez mais rápidos e sensíveis. Em adição, em virtude da livre circulação de alimentos entre diferentes países e regiões, parece lógico adotar uma política similar nas agências reguladoras de cada país, principalmente no que diz respeito às metodologias de pesquisa, níveis de tolerância de micro-organismos em alimentos e à padronização dos alimentos.

3.3 Produtos lácteos

3.3.1 O Doce de Leite

O doce de leite é um dos principais produtos concentrados por ação do calor produzidos pelas indústrias de laticínios no Brasil. A produção nacional de doce de leite, embora tenha se mantido estável nos últimos dez anos, atingiu seu ápice em 1995 com 52,3 toneladas produzidas (MACHADO, 2005). Nos últimos cinco anos, a produção se encontra ao redor de 34 toneladas/ano (MADRONA et al., 2009). De acordo com o Instituto de Desenvolvimento Industrial de Minas Gerais (INDI), 50% da produção brasileira de doce de

leite está concentrada em Minas Gerais. O doce de leite é consumido em grande parte na América do Sul, especialmente no Brasil, Uruguai e Argentina (PAVLOVIC et al., 1992). Segundo o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Doce de Leite, aprovado pela Portaria N° 354 de 4 de setembro de 1997 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 1997), entende-se por doce de leite, o produto com ou sem adição de outras substâncias alimentícias, obtido por concentração e ação do calor a pressão normal ou reduzida do leite ou leite reconstituído, com ou sem adição de sólidos de origem láctea e/ou creme e adicionado de sacarose (parcialmente substituída ou não por monossacarídeos e/ou outros dissacarídeos). Na Figura 1 é apresentado um fluxograma da fabricação do doce de leite.

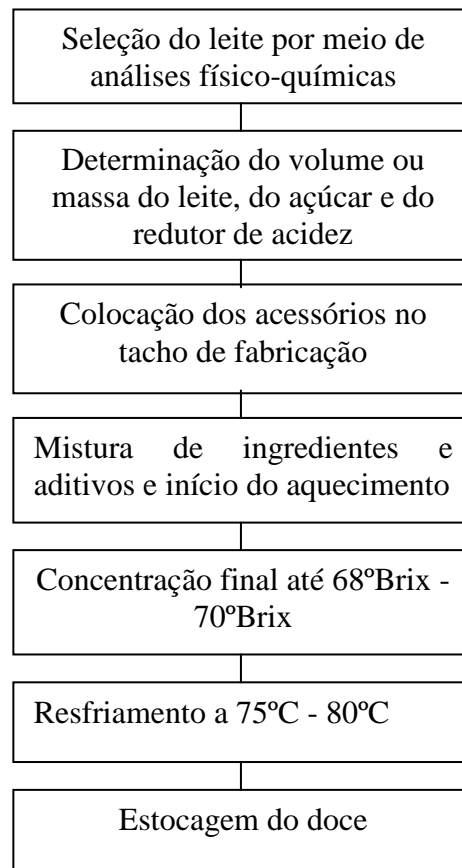


Figura 1 - Fluxograma de fabricação do doce de leite proposto por Perrone et al. (2011).

A produção de doces de leite de qualidade está diretamente relacionada à qualidade da matéria-prima empregada na fabricação e esta, por sua vez, depende:

- Qualidade sensorial - não deve apresentar anormalidades de cor, sabor, odor ou aparência);

- acidez - o leite apresenta acidez titulável elevada para a produção do doce podendo resultar na precipitação da caseína, diante disto, a redução da acidez pela adição de bicarbonato de sódio é indicada, até uma faixa de 0,12 % a 0,13 % de ácido láctico;
- matéria gorda - importante para o rendimento, brilho e textura do produto (MARTINS e LOPES, 1981).

Durante a concentração, algumas substâncias entram em estado de supersaturação, podendo cristalizar e precipitar (WALSTRA et al., 2001). Silva et al. (1984) enfatizam que entre as dificuldades técnicas que se têm apresentado na fabricação de doce de leite, em escala industrial, talvez a mais difícil de vencer tem sido os procedimentos seguidos para minimizar os efeitos da cristalização. Os cristais formados conferem ao doce uma textura arenosa, constituindo assim um importante problema tecnológico (TERÁN-ORTIZ, 1998). Vários processos têm sido empregados no controle da cristalização (COELHO et al., 1982; HOSKEN, 1969; SABIONI et al., 1984; SANTOS, 1976; SILVA et al., 1984; TERÁN-ORTIZ, 1998).

Tecnologicamente, o doce de leite se enquadra entre os produtos de leite conservados por evaporação e adição de açúcar, de modo que, em função da alta pressão osmótica criada, pode ser conservado em temperatura ambiente (MADRONA et al., 2009). O desenvolvimento microbiano depende de vários fatores isolados e em conjunto, dos quais podemos destacar a disponibilidade de água. Ao analisarmos o teor de sólidos solúveis de produtos lácteos concentrados, temos uma idéia da quantidade total de água presente no produto final, desta forma, uma interpretação inicial é que quanto maior o teor de sólidos solúveis, menor é a quantidade de água no produto e conseqüentemente mais difícil é o desenvolvimento dos micro-organismos. Entretanto, esta análise da situação é superficial, pois há de se conhecer não somente a quantidade de água, mas também a magnitude das interações químicas e o número de configurações espaciais das moléculas dentro da matriz do produto. A análise de determinação da atividade de água é um indicativo das propriedades que as moléculas de água apresentam na matriz do produto quando comparada às propriedades que apresentam em água pura. Desta forma, quanto mais o valor numérico da A_w diminuir em relação ao número 1, menor será a disponibilidade de água para o desenvolvimento microbiano (TAN, 2009). Segundo o mesmo autor, a sacarose é indiscutivelmente o primeiro soluto responsável pela diminuição da A_w . A concentração de sacarose em água, nos produtos lácteos concentrados, deve estar entre 0,625 e 0,645, sendo esta a faixa ideal para inibir o desenvolvimento de micro-organismos e não propiciar a cristalização da sacarose no produto, pois, abaixo do valor 0,625 a atividade de água será maior que 0,85, tornando o produto microbiologicamente

instável. Acima de 0,645 ocorre a cristalização da sacarose na solução, o que seria um defeito em produtos como doce de leite, leite condensado e sorvete (HALL e HEDRICK, 1971).

De acordo com Timm et al. (2007), a possibilidade de bactérias patogênicas em doce de leite não pode ser excluída, apesar deste produto apresentar baixa atividade de água devido à alta concentração de carboidratos. O doce de leite propicia além do desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras osmofílicas, o crescimento de *Staphylococcus* spp. resistentes a alta pressão osmótica do meio, sendo estes, potenciais produtores de enterotoxinas causadoras de intoxicação alimentar (ALAIS, 1985). Pereira e colaboradores (1991), em um estudo com creme de confeitaria e presunto cozido, demonstrou que 10^3 células de *Staphylococcus aureus.g*⁻¹ foram suficientes para produção de enterotoxina D, após 24 h de incubação à 37°C e a produção da toxina era correlacionada à produção da enzima coagulase. Em função desta correlação, no ano de 2001, a Legislação Brasileira de Padrões Microbiológicos para Alimentos sofreu alteração. A determinação de *S. aureus* foi substituída por enumeração de “Estafilococos coagulase positiva” (BRASIL, 2001). O Quadro 1 apresenta os critérios microbiológicos e de tolerância para o doce de leite segundo o MAPA (BRASIL, 1997).

Quadro 1 - Critérios microbiológicos e tolerância para doce de leite de acordo com a Portaria N° 354 de 1997 do MAPA.

Micro-organismo	Critério de Aceitação (UFC/g)
Estafilococos Coag. Pos./g	n=5 c=2 m=10 M=100
Bolores e leveduras/g	n=5 c=2 m=50 M=100

Legenda: n = número de amostras do lote; c = número de aceitação; m = limite inferior; M = limite superior.

Os órgãos de regulamentação em países como Canadá, Estados Unidos e aqueles pertencentes à União Européia ainda preconizam a determinação de *S. aureus* em alimentos. No entanto, a enumeração de Estafilococos coagulase positiva em alimentos subestima a quantidade de *Staphylococcus* spp. potencialmente enterotoxigênicos. Para a garantia da segurança alimentar, o leite a ser utilizado na fabricação do doce de leite deve ter a sua qualidade microbiológica assegurada, o que muitas vezes não é levado em consideração pelos fabricantes.

3.3.2 O Leite Condensado

Leite condensado ou “leite condensado com açúcar” é o produto resultante da desidratação parcial do leite fluido ao qual é adicionado xarope (glicose ou sacarose) seguindo de condensação, refrigeração, cristalização e envasamento (BRASIL, 1952). Gail Borden é considerado o inventor do leite condensado no ano de 1856. Entretanto, somente em 1885, nos Estados Unidos, começou-se a produção e comercialização industrial deste produto (PERRONE et al., 2011).

Em 2009, o leite condensado foi o principal produto lácteo da pauta de exportação do Brasil e em 2010, os valores exportados cresceram 11,3% em relação a 2009, sendo atualmente o principal produto lácteo na pauta de exportação brasileira com 2.146.622 kg em volume e US\$ 4.618.956 em valores em setembro de 2011 (MDIC, 2011).

O doce de leite e o leite condensado açucarado são produtos semelhantes, provenientes da concentração do leite adicionado de açúcar, sendo a principal diferença entre eles, resultante da tecnologia de processamento. O leite condensado exige equipamento mais sofisticado, devido a sua evaporação se processar a vácuo, enquanto na fabricação de doce de leite utilizam-se, na maioria das vezes, tachos abertos providos de aquecimento a vapor. Na Figura 2 é apresentado o fluxograma da tecnologia de produção de leite condensado proposto por Perrone et al. (2011). Segundo o mesmo autor, para a obtenção do leite condensado os atributos importantes de qualidade a estabilidade térmica do leite são os teores de gordura, de proteínas, de proteínas no extrato seco total e o de sólidos lácteos totais. Outro ponto importante é a qualidade do açúcar, principalmente em produto que será homogeneizado, uma vez que muitas impurezas podem ser encontradas em açúcar de baixa qualidade, sendo comum nas fábricas um setor para diluição, filtração e centrifugação do açúcar denominado xaroparia.

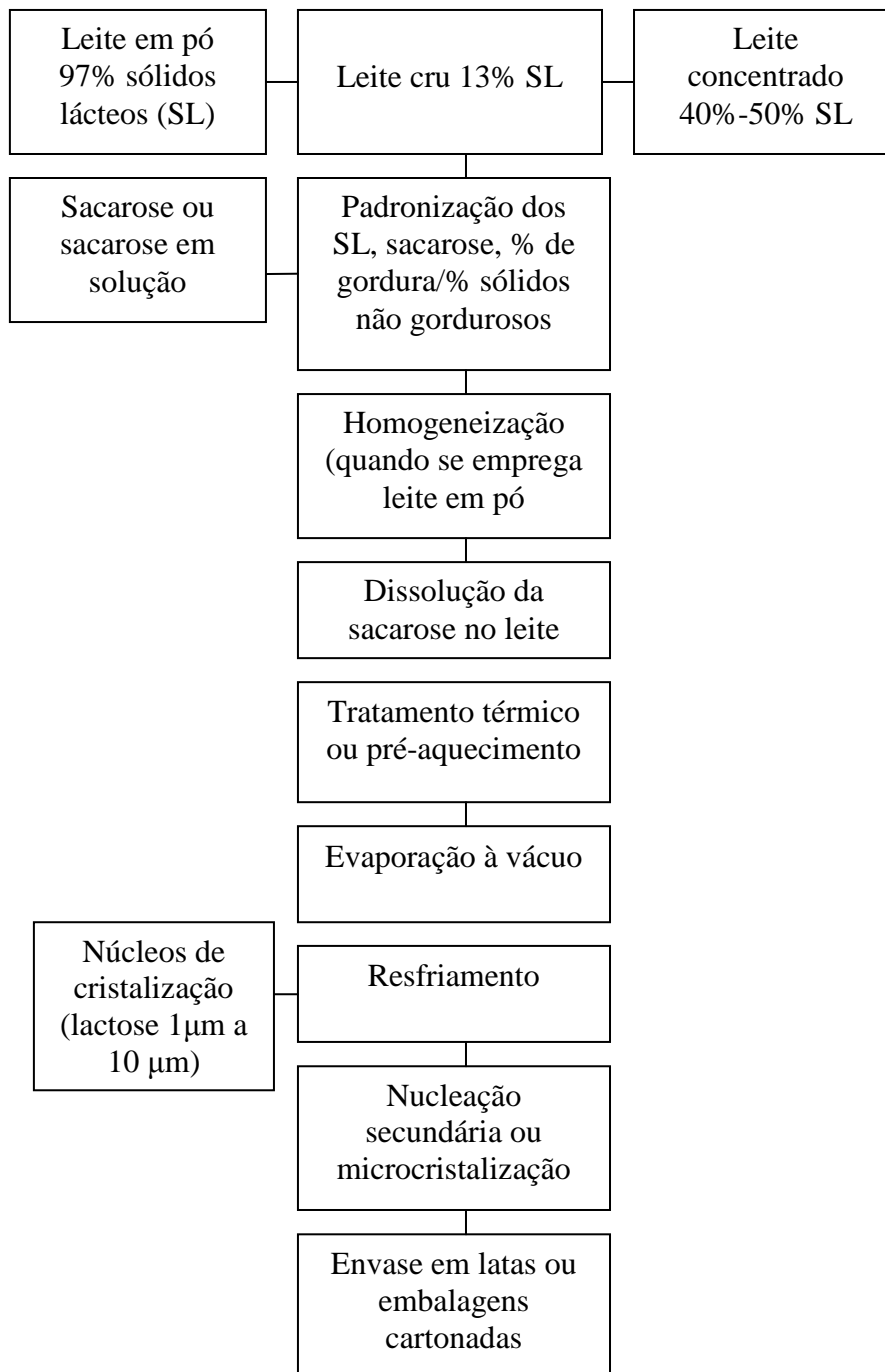


Figura 2 - Fluxograma da fabricação do leite condensado.

A etapa de evaporação a vácuo do leite, causa o aumento no teor de sólidos até a magnitude desejada no produto final, diminui a atividade de água, contribuindo para a conservação do leite condensado e promove a saturação da lactose, tornando o meio propício à cristalização desejada da mesma. Spreer (1991) enfatiza que a cristalização deve ser orientada para que ocorra a formação de inúmeros cristais pequenos imperceptíveis ao paladar. Esta microcristalização, como descreve Whittier (1944), ocorre melhor a 30°C que a

25°C, o que mostra a importância desta etapa de formação e crescimento dos cristais de lactose. Na produção de leite condensado, o defeito da cristalização é prevenido pela semeadura de microcristais de lactose, mas, podem ocorrer problemas de contaminação oriundos da temperatura (30°C) em que é realizada essa semeadura, o que pode favorecer o desenvolvimento dos micro-organismos mesófilos (MARTINEZ et al., 1990).

O processamento de leite condensado resulta em um produto com alta concentração de solutos, fator este que inibe o crescimento da maioria dos micro-organismos pela redução na atividade de água (WALSTRA, 2001). De acordo com Varnam e Sutherland (1995), apesar da baixa atividade de água do leite condensado inibir o crescimento de uma grande gama de bactérias, os bolores e as leveduras são capazes de se desenvolver. Dessa forma, são necessários controles higiênicos severos e específicos durante as etapas de fabricação bem como o uso de embalagens herméticas, o que contribui consideravelmente para a manutenção da qualidade do produto enlatado, pois a ausência de oxigênio inibe o crescimento de micro-organismos aeróbios, até mesmo daqueles que são capazes de tolerar uma pressão osmótica alta (ROBINSON, 1981). Bactérias osmotolerantes como as do gênero *Staphylococcus*, possuem uma resistência bastante alta ao calor, podendo tolerar temperaturas de 60°C por meia hora e sua resistência a pressões osmóticas elevadas os auxilia a crescer em alimentos açucarados, em que uma alta pressão osmótica inibe o crescimento de competidores (TORTORA et al., 2003). O desenvolvimento de leveduras capazes de fermentar o açúcar produzindo gás, e de *Staphylococcus* spp. resistentes à alta pressão osmótica do meio, pode causar desde um estufamento da embalagem, causado pela grande quantidade de CO₂ produzido pelas leveduras, até intoxicações alimentares, pois, as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. são potenciais produtoras de enterotoxinas (ALAIS, 1995).

3.3.3 O Queijo Minas Padrão

Mais de 1.000 variedades de queijos são produzidas atualmente no mundo, com uma produção que excede a 14 milhões de toneladas. O queijo destaca-se entre os derivados lácteos pelo alto teor de proteína e outros nutrientes. Com o desenvolvimento tecnológico de sua produção surgiram, no Brasil, muitas variedades, sendo algumas de expressão regional (BORGES et al., 2003). O Brasil, com uma produção anual de 640 mil toneladas de queijos, ocupa o terceiro lugar no cenário mundial, sendo superado apenas pela União Européia e pelos Estados Unidos (ESTATÍSTICAS..., 2008). Em 2009, a produção de queijos produzidos sob inspeção (formal) foi de 721 mil toneladas. Contudo, considerando que o mercado de

queijos formais equivale a 60% do mercado total, pode-se concluir que o mercado de queijos no Brasil ultrapassou um milhão de toneladas em 2009 (ABIQ, 2010). Minas Gerais, por sua tradição, clima e topografia, é o maior estado produtor de leite e queijos do Brasil, sendo responsável por mais da metade da produção nacional (ESTATÍSTICAS..., 2008). Entre os queijos de massa crua, o Minas Frescal e o Minas Padrão são os mais populares e representam juntos cerca de 8% do mercado brasileiro, ocupando a terceira posição no consumo. Em 2009, o queijo Minas Padrão foi fabricado em um volume total de 8 mil toneladas, o que representa um crescimento de 10% no volume produzido em relação ao ano de 2008 (ABIQ, 2010).

Por definição oficial, o queijo Minas Padrão, Minas Curado, Minas Padronizado ou Minas Prensado é o produto obtido de leite integral ou padronizado, pasteurizado, de massa crua, prensado mecanicamente e devidamente maturado durante 20 dias. Deve apresentar formato cilíndrico, de faces planas e bordos retos, formando ângulo vivo; peso entre 1 kg a 1,2 kg, crosta fina; consistência semidura, macia, de untura manteigosa; textura, buracos mecânicos e em cabeça de alfinete, pouco numerosos; cor branco-creme, homogênea; odor e sabor próprios, ácidos, agradáveis e não picantes segundo RIISPOA (BRASIL, 1997).

O queijo Minas Padrão é um queijo de origem brasileira, produzido em vários estados. É um queijo que utiliza fermento láctico mesofílico, adicionado ao leite durante sua fabricação e possui um período de maturação curto que varia de 20 a 30 dias em câmara fria a 10°C - 12°C. Os problemas com a produção de queijo no Brasil estão relacionados às condições higiênico-sanitárias do leite produzido, às de fabricação e à ineficiência do sistema de refrigeração ao longo da cadeia produtiva, que agravam a situação e criam condições de contaminação e desenvolvimento de micro-organismos (LISITA, 2005).

Dentre os produtos derivados do leite, o queijo é considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar e, na maioria das vezes, não sofrem processo de maturação. A contaminação microbiana desse produto assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (FEITOSA, 2003). A qualidade e durabilidade de um produto dependem, em grande parte, da matéria-prima utilizada na sua fabricação. É difícil melhorar a qualidade de um produto, se o número de micro-organismos inicialmente presentes no leite *in natura* é elevado. Além da matéria-prima destaca-se como pontos críticos no processamento desses queijos, o tanque de coagulação e a salmoura. Durante a coagulação, o número de bactérias presentes no leite, sejam lácteas ou contaminantes, aumenta cerca de dez vezes. Ainda que o queijo não seja recontaminado durante o processamento, pode haver recontaminação durante sua permanência na salmoura, pois, esta é capaz de albergar micro-

organismos osmotolerantes (NERO, 2005). Este fato é atestado pela sobrevivência, por várias semanas, de *E. coli* O157:H7 em salmouras típicas (INGHAM et al., 2000).

Bactérias do grupo coliformes são indicativas de condições higiênico-sanitárias inadequadas durante o processamento de queijos, podendo degradar toda a lactose dentro de 24h a 48h e provocar o defeito conhecido como estufamento precoce (SANGALETTI, 2007). Além das bactérias deterioradoras, diversos surtos de doenças têm sido associados à ingestão de queijos, em razão, principalmente, da presença de bactérias patogênicas como *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. (SALOTTI et al., 2006). Falhas ocorridas durante todo o processamento, aliadas a temperaturas inadequadas de conservação durante a comercialização, são fatores que têm contribuído para venda de queijos fora dos padrões regulamentares (SANGALETTI, 2007). A dificuldade de exportação e os principais problemas com a produção de queijos no Brasil estão relacionados principalmente com a baixa qualidade do leite produzido, as péssimas condições de fabricação e a falta ou ineficiência da cadeia de frio. Além disso, há no País o predomínio da utilização de metodologias clássicas para análises microbiológicas de patógenos inviabiliza a liberação rápida do produto para o mercado devido à morosidade na obtenção dos resultados, problema que poderia ser facilmente resolvido caso fossem utilizadas metodologias alternativas, mais rápidas e muitas vezes mais sensíveis que a clássica (LISITA, 2005).

3.4 Métodos para caracterização microbiológica

A busca por uma metodologia adequada e eficiente para detectar micro-organismos em alimentos tem sido constante pelos pesquisadores da área (GIOMBELLI, 2000). Muitos métodos podem ser utilizados para uma mesma determinação, conseqüentemente, a escolha do melhor método dependerá do critério microbiológico adotado e da estrutura do laboratório (FRANCO e LANDGRAF, 2004). Inúmeros métodos laboratoriais de análises (convencionais e rápidos) podem ser utilizados para um mesmo fim, por isso, é importante considerar quais os objetivos da análise, uma vez que estes determinam o seu tipo (um indicador ou um patógeno), o método (rapidez, precisão, repetibilidade, reprodutibilidade, etc.), a alíquota analisada (produto final ou da linha de produção), a interpretação do resultado, as ações a adaptar e os reajustes do processo (FRANCO, 1999; FRANCO e LANDGRAF, 2004; ICMSF, 2002).

Recentemente, a necessidade de acreditação e o conceito de gerenciamento da qualidade total tem resultado em um aumento da demanda para validação de métodos de

controle de qualidade laboratorial. Entretanto, problemas associados com a diversidade da microbiota não desejada, a injúria e estresse do micro-organismo, a influência dos constituintes dos alimentos na produtividade e seletividade dos meios de cultura ainda existem. A influência destes fatores pode ser minimizada se métodos validados para o efetivo controle de qualidade para meios de cultura forem desenvolvidos e experimentados. Cada laboratório pode ser responsável pelo desenvolvimento de seus próprios protocolos desde que considere esses fatores (CURTIS e BEUCHAT, 1998).

3.4.1 Metodologia tradicional

Os métodos de detecção de patógenos veiculados por alimentos, geralmente são complicados e consomem tempo. Em certos casos, são necessários vários dias para estabelecer identificação de uma bactéria em particular (ASLAM et al., 2003). Os protocolos recomendados nas metodologias tradicionais envolvem vários caldos de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo, assim como plaqueamento em meios de isolamento seletivo, alguns deles muito inibitórios, de execução laboriosa e lenta, além de não apresentarem sensibilidade para detectar pequenos números do micro-organismo em alimentos contaminados (ALMEIDA e ALMEIDA, 2003; RODRIGUES et al., 2003). Além disso, propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser expressas e, quando expressas, ainda existe a dificuldade de interpretação dos resultados e classificação (MALORNY et al., 2003).

No caso de *E. coli* O157:H7, duas características deste sorotipo são exploradas para diferenciá-lo dos outros: a incapacidade de fermentar o sorbitol (sob condições normais) e a ausência de β -glicuronidase (BOTTELDOORN et al., 2003). As outras *E. coli* são sorbitol positivas (80,3%) e aproximadamente 97% apresentam β -glicuronidase (OKREND et al., 1990). Assim, testes tradicionais para detectar *E. coli* podem não detectar a *E. coli* O157:H7 porque este patógeno responde diferentemente em certos testes.

Sanderson et al. (1995) concluíram que o enriquecimento da amostra e posterior plaqueamento da mesma em ágar TC-SMAC (agar MacConkey sorbitol suplementado com cefixime e telurito de potássio) é o método mais sensível para a detecção de *E. coli*. Como *E. coli* não é o único micro-organismo que cresce e não fermenta o sorbitol neste meio, colônias suspeitas podem ser analisadas para a presença dos antígenos O157 e H7 através de anti-soro ou kits de aglutinação em látex (MEAD e GRIFFIN, 1998). Os testes microbiológicos padrões para *E. coli* O157:H7 podem confirmar uma amostra negativa em 24 horas, mas,

requerem seis dias para confirmação de uma amostra positiva (DUNCAN e HACKNEY, 1994).

Dentre os métodos convencionais para detecção e isolamento de *L. monocytogenes*, destacam-se os recomendados pelo *U. S. Department of Agriculture* (USDA), pelo *Food and Drug Administration* (FDA), pelo *Health Protection Branch* do Canadá (LOVETT, 1988) e pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC)/*International Dairy Federation* (IDF), sendo este último o de escolha mais frequente para detectar este micro-organismo em produtos lácteos. Independentemente do método usado, a identificação microbiológica positiva de *L. monocytogenes* pode demorar de sete a 12 dias, quando a confirmação presuntiva é realizada bioquimicamente (RIJPENS e HERMAN, 2004).

As técnicas convencionais para detecção de *Salmonella* sp. em alimentos, embora apresentem algumas variações na seleção dos meios de cultura e na forma de preparação das amostras envolvem basicamente quatro etapas que podem ser aplicadas a qualquer tipo de alimento: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em meios seletivos sólidos e identificação completa das colônias por meio de teste bioquímicos e sorológicos (BOER e BEUMER; 1999; GIOMBELLI e SILVA, 2002; REIS et al., 2002; SILVA et al., 1997). Muitos estudos têm revelado diferenças significativas entre os resultados obtidos com métodos tradicionais, principalmente no que se refere aos meios de cultura e às temperaturas de incubação utilizada nas etapas de seu procedimento (HUANG et al., 1999; GIOMBELLI, 2000; GIOMBELLI e SILVA, 2002; NASCIMENTO et al., 2000).

O método microbiológico utilizado para enumeração de *S. aureus* em alimentos é o de contagem em placas utilizando o ágar Baird - Parker. Este é o meio de cultura recomendado pela *American Public Health Association* (APHA) e pelo *Food and Drug Administration* (FDA). As colônias suspeitas são confirmadas em testes bioquímicos: coagulase, catalase, fermentação anaeróbica de glicose e manitol, produção de termonuclease e sensibilidade a lisostafina que podem levar até seis dias para fornecer um resultado (SILVA et al., 1997).

Segundo Fung apud Boer e Beumer (1999), os métodos bacterianos convencionais são sensíveis, econômicos e podem dar informações ao mesmo tempo do número e da natureza dos micro-organismos presentes na amostra de alimento, porém requerem até 12 dias para a confirmação dos resultados, uma vez que dependem da habilidade dos micro-organismos em multiplicar-se em colônias visíveis. Além disso, a preparação de meio de cultura, a inoculação em placas, a contagem de colônias e a caracterização bioquímica fazem desses métodos trabalhosos. Portanto, o emprego de métodos rápidos, simples e confiáveis, é importante tanto

no diagnóstico de toxi-infecção, como também, e principalmente, no controle de qualidade de alimentos (ALCOCER e OLIVEIRA, 2003).

Especialmente na indústria de alimentos são necessários métodos mais rápidos para fornecer informações adequadas da possível presença de patógenos em matérias-primas e produtos finais possibilitando a intervenção no controle do processo de fabricação e para o monitoramento das práticas de limpeza e higiene. Esses métodos rápidos detectam e enumeram os micro-organismos com prematuridade, e possibilitam a sua caracterização e isolamento para uso microbiológico, químico, imunológico, sorológico e molecular.

3.4.2 Metodologias alternativas para detecção de patógenos

Nos últimos anos, vários métodos para detecção rápida de patógenos foram propostos e dentre eles destacam-se as técnicas imunológicas e moleculares, pela necessidade de abreviar o tempo para a obtenção de resultados analíticos e melhorar a produtividade laboratorial (BEUMER et al., 1991; FRANCO, 1999). Rapidez nos resultados, alta sensibilidade e especificidade são pontos cruciais para monitorização em sistemas de gestão de qualidade e segurança alimentar, como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

3.4.2.1 Técnicas imunológicas

Os imunoenaios enzimáticos (EIA) baseados em técnicas de triagem podem contribuir para acelerar e simplificar a detecção de diversos tipos de patógenos em alimentos (AOAC, 2002) e são muito empregados por apresentarem diversas vantagens como simplicidade, rapidez, sensibilidade, especificidade e conveniência como método de triagem (FRANCO, 1999). As técnicas imunológicas, baseadas nas reações antígeno-anticorpo empregam anticorpos marcados com uma enzima cromogênica facilitados por leitores automatizados sendo utilizado como método de triagem. Inúmeros *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISA) foram desenvolvidos, usando anticorpos policlonais e monoclonais que são capazes de detectar muitos sorotipos de patógenos associados às toxi-infecções humanas (ALCOCER e OLIVEIRA, 2003; BEUMER et al., 1991; FRANCO, 1999; REIS, et al., 2001). Os métodos imunológicos contam com a especificidade de ligação do anticorpo com o antígeno. Para detecção de um micro-organismo ou toxina microbiana específica, uma variedade de anticorpos é aplicada em diferentes tipos de amostras. A

adequação desses anticorpos depende geralmente de sua especificidade. Antissoros policlonais contêm uma variedade de anticorpos originários de diferentes células e, portanto, de diferentes especificidades. Muitos anticorpos usados em imunoenaios são derivados do soro de coelho ou carneiro. A desvantagem no uso de antissoro policlonal em imunoenaios é a inconstância da resposta imune do animal. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais aumentou muito o campo dos imunoenaios devido à comprovação consistente e pesquisas confiáveis de caracterização de anticorpos (BOER e BEUMER, 1999).

Entre os vários tipos de testes imunoenzimáticos existentes, o tipo não competitivo (tipo sanduíche) é o mais empregado nos sistemas de triagem de micro-organismos patogênicos em alimentos. O produto em teste é capturado por aglutinação por meio de anticorpos específicos adsorvidos à superfície de uma matriz sólida. Na etapa seguinte, o complexo antígeno-anticorpo reage com o conjugado preparado, por meio da ligação do anticorpo específico para o micro-organismo a ser detectado e com uma enzima cromogênica. As enzimas mais utilizadas nesses testes são a fosfatase alcalina, peroxidase e a β -galactosidase. Após um período, o conjugado não ligado presente é lavado e uma substância é adicionada. Em seguida, o sanduíche formado reage com o substrato da enzima cromogênica, resultando no desenvolvimento de cor (BOER e BEUMER, 1999; FRANCO, 1999; SILVA et al., 1997).

Os microbiologistas de alimentos podem ainda utilizar o sistema *Vitek Immuno Diagnostic Assay System* (VIDASTM, BioMérieux). Trata-se de um sistema de análise qualitativa imunoenzimática automatizada que utiliza pela técnica ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) uma mistura de anticorpos monoclonais de captura com grande especificidade para detecção de antígenos (cepas móveis e imóveis) de patógenos nos produtos alimentares e nas amostras ambientais. Todas as etapas do teste são executadas automaticamente utilizando galerias plásticas descartáveis, constituídas de compartimentos contendo os reagentes necessários para o teste. A leitura e interpretação dos resultados também são automáticas (AOAC, 2002; BOER e BEUMER, 1999; FRANCO, 1999; REIS et al., 2001).

Em várias pesquisas conduzidas para investigar a possibilidade do emprego da técnica imunoenzimática para detecção de patógenos em alimentos verificou-se que quando utilizada com culturas puras ou aplicadas em alimentos experimentalmente ou naturalmente contaminados, apresentou alta especificidade e/ou sensibilidade nos vários tipos de alimentos testados (DICKER et al., 2005; REIS et al., 2001).

3.4.2.2 Técnicas moleculares

Técnicas moleculares consistem em importantes métodos de detecção de patógenos em alimentos (HSU e TSEN, 2001; MCKILLIP et al., 2000). Em 1983, o desenvolvimento da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) por Kary B. Mullis (MULLIS e FALOONA, 1987; MULLIS, 1990) foi considerado como o grande avanço da biologia molecular. Devido ao alcance da popularidade da técnica, Kary B. Mullis recebeu o prêmio Nobel de Química em 1993. Esta técnica estendeu o alcance da análise de DNA e fez com que a biologia molecular encontrasse novas aplicações, inclusive em áreas fora do seu campo tradicional, tais como, medicina, agricultura e biotecnologia (BROWN, 2003). A PCR reproduz *in vitro* a habilidade natural de replicação do DNA, podendo ser repetida em larga escala. A metodologia requer, primeiramente, o conhecimento, pelo menos parcial, do DNA alvo de um determinado organismo, para o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que irão hibridizar-se especificamente à sequência alvo (YANG e ROTHMAN, 2004).

A técnica PCR é apontada como um método muito eficiente na detecção de vários patógenos em alimentos. A introdução do método de PCR no diagnóstico microbiano é uma valiosa alternativa à metodologia tradicional. Rápido, com bom limite de detecção, seletivo, específico, sensível e com potencial para automatização estão entre suas grandes vantagens (MALORNY et al., 2003). Com o aumento do número de genomas de patógenos sendo sequenciados, catálogos de genes podem ser explorados para o desenvolvimento de testes diagnósticos baseados em PCR; como resultado, desde a década passada, encontram-se disponíveis comercialmente muitos ensaios baseados nesta técnica, os quais continuam a se expandir. No caso de células mortas, os enriquecimentos seletivos permitem que só as células vivas sejam alvo de detecção, evitando resultados falso-positivos. No caso de células viáveis, mas não cultiváveis, podem causar infecção e apesar de não serem detectadas nos enriquecimentos seletivos, podem sê-lo por PCR, apresentando assim mais uma vantagem de utilização desta técnica (ARCURI et al., 2004). Nas duas últimas décadas, a técnica da PCR tem sido modificada para expansão do seu uso e versatilidade (YANG e ROTHMAN, 2004). A possibilidade de utilização, na mesma reação, de mais de um par de *primers* com amplificação simultânea de múltiplas sequências do DNA-alvo é chamada de multiplex-PCR. Assim, mais de uma sequência de DNA, em uma mesma amostra, pode ser amplificada ao mesmo tempo (BAHK et al., 2004; CHAMBERLAIN et al., 1988; GEHA et al., 1994; REA et al., 2001). Apesar da PCR e suas variações serem altamente sensíveis e específicas, apresentam algumas limitações, tais como, a necessidade de se realizar a eletroforese em gel

de agarose ou poliacrilamida, o uso de reagentes nocivos à saúde do operador, como, por exemplo, o brometo de etídeo, riscos de contaminação e a ausência da capacidade quantitativa. Estas desvantagens passaram a ser mais evidenciadas no final do século XX e início do século XXI devido ao surgimento de uma nova tecnologia, a quantitativa PCR em tempo real (qPCR).

No início da década de 1990 estudos passaram a explorar a atividade exonucleásica da enzima *Taq* polimerase para o desenvolvimento de sondas *TaqMan* (HOLLAND et al., 1991). Em 1992, Higuchi e colaboradores passaram a explorar a capacidade quantitativa da PCR utilizando o brometo de etídeo (HIGUCHI et al., 1992). Tais estudos promoveram um refinamento da original PCR de Kary Mullis e surgimento da PCR em tempo real, representando um significativo avanço biotecnológico para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. PCR em tempo real quantitativa (qPCR) entrou recentemente no campo da ciência e tecnologia de alimentos. Métodos moleculares têm se tornado reconhecidos como ferramentas poderosas e confiáveis para uso na garantia qualidade e segurança alimentar. Novas aplicações incluem a detecção de ingredientes alimentares, bacteriófagos, deterioradores, acompanhamento da contaminação indesejada de alimentos especiais (por exemplo, alimentos sem glúten), estudo de genes codificadores de toxinas, detecção de organismos geneticamente modificados, alérgenos e fraude (FISCHER et al., 2007; KÖPPEL et al., 2010; MAFRA et al., 2008; RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2007; SANDBERG et al., 2003; TANABE et al., 2007). Uma das melhores aplicações desenvolvidas e bem sucedidas de qPCR é a detecção e quantificação de patógenos (LEVIN, 2004).

Os métodos de detecção usados em qPCR podem ser classificados em dois sistemas principais: (i) não específico, sistema que detecta qualquer DNA dupla fita produzido na reação, e (ii) sequência-específica, sistema que distingue sequências-alvo de sequências não-específicas. O primeiro sistema é baseado no uso de corantes ou sondas fluorescentes que permitem o monitoramento em tempo real do produto amplificado. Um corante bastante utilizado é a SYBR *Green* I (Figura 3), que se liga inespecificamente a fitas duplas de DNA geradas durante a amplificação. Trata-se de uma assimétrica cianina que, livre em solução não emite fluorescência, mas, ligada a moléculas de DNA emite um forte sinal luminoso (NYGREN et al., 1998).

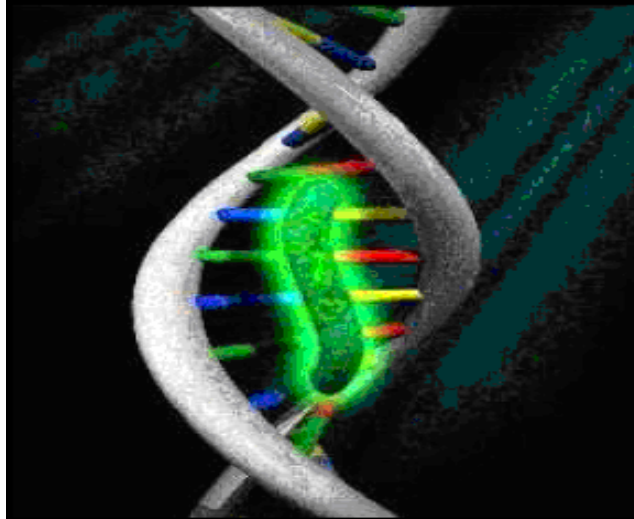


Figura 3 - Corante SYBR *Green I* intercalando uma fita dupla de DNA formada durante a reação de PCR em tempo real. Fonte: *Applied Biosystems*™ - by *Life Technologies*™.

O segundo sistema que usa outra forma de gerar a fluorescência é o uso de uma sonda fluorescente, dirigida especificamente a uma região interna da sequência que se deseja amplificar e, seu uso acrescenta um nível adicional de especificidade para a reação de amplificação. Um exemplo deste sistema, usado neste estudo, é a sonda *TaqMan* (Figura 4).

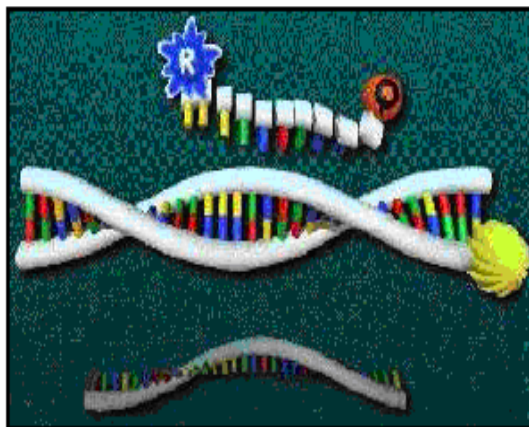


Figura 4 - Sonda *TaqMan* sendo degradada após a adição dos nucleotídeos por ação da *taq*-polimerase durante a reação de PCR em tempo real. Legenda- R: *reporter*; Q: *quencher*. Fonte: *Applied Biosystems*™ – by *Life Technologies*™.

À medida que vai ocorrendo a amplificação, a *Taq* DNA polimerase, pela sua atividade exonucleásica, desloca-se para a extremidade 5' da sonda *TaqMan* (contendo o

fluorocromo, *reporter*) e cliva a sonda. Pelo fato do *reporter* ser liberado e não permanecer próximo ao *quencher*, há liberação de fluorescência (MORTARINO et al., 2004; YANG e ROTHMAN, 2004). A análise da emissão de luz é feita por um detector de sinal luminoso e um amplificador de sinal que traçam um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo da PCR, a intensidade do sinal gerado reflete a quantidade do produto formado (KUBISTA et al., 2006). O ciclo onde o sinal de amplificação exponencial atinge uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção (*Threshold*) é denominado Ct e o momento em que o Ct ultrapassa o *Threshold* é proporcional ao número de cópias iniciais de DNA (LOGAN et al., 2009) (Figura 5).

Na Figura 5, as linhas coloridas representam quantidades decrescentes de DNA alvo (100 pg a 0,1 fg); quanto maior a quantidade de DNA (primeira linha verde), menor o valor de Ct (menos ciclos de amplificação são necessários para atingir o limite de detecção).

A análise dos resultados de um ensaio de PCR em tempo real é feita por meio dos gráficos gerados no computador interligado ao termociclador. Basicamente, são efetuadas quatro análises: 1) Curva de amplificação, 2) Curva de dissociação (somente para *Syber Green*), 3) Espectro e 4) Componente (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005). Os quatro parâmetros devem ser analisados em conjunto. Padrões com concentrações pré-determinadas

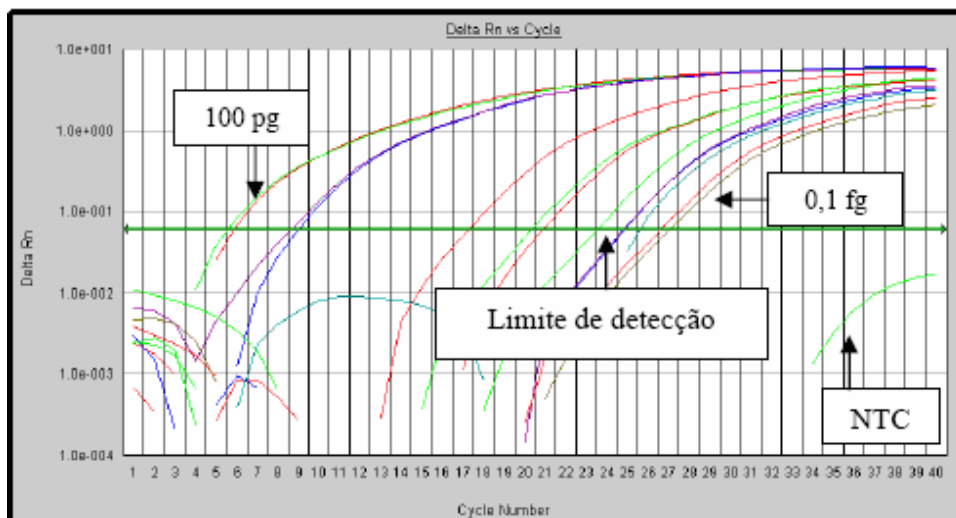


Figura 5 - Curva de amplificação. Legenda- NTC: controle negativo (sem amplificação).

de DNA alvo e controles negativos (NTC: *non template control*) devem ser incluídos em todas as reações e avaliados em primeiro lugar.

Uma modificação dessa técnica que vem sendo utilizada de maneira crescente nos últimos anos para identificação bacteriana é o *multiplex* PCR (mPCR), utilizada neste estudo.

Nessa técnica utilizam-se mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de sequências de DNA, portanto, mais de uma espécie bacteriana podem ser identificadas na mesma reação PCR, promovendo uma análise mais ampla, mais rápida e mais barata da presença de bactérias patogênicas em alimentos (GANDRA, 2006). Entretanto, entre os inconvenientes dessa técnica, destaca-se a probabilidade da ocorrência de inibidores de reação, portanto, há necessidade da inclusão de um IAC (*Internal Amplification Control*) para evitar resultados falso-negativos (KLERKS et al., 2004). O IAC permite a detecção da presença de inibidores e é muito útil na identificação de resultados falso-negativos (SCHNEIDER et al., 2009). O IAC é uma sequência não alvo, colocada junto com a amostra na reação, e que é amplificada simultaneamente. Em uma PCR sem um IAC, uma resposta negativa (ausência de banda ou sinal) pode significar a ausência do alvo na reação, mas pode significar, também, que a reação foi inibida devido ao mau funcionamento do termociclador, mistura incorreta dos reagentes da PCR, atividade inadequada da DNA polimerase, ou presença de substâncias inibidoras na matriz da amostra (HOORFAR et al., 2004 apud RADSTRÖM et al., 2003). Ao contrário, em uma PCR com a inclusão de um IAC, havendo DNA, o sinal de controle será produzido mesmo que a sequência alvo não esteja presente.

A precisão da PCR em tempo real é influenciada pelo desenho do *primer*, pela qualidade do DNA, presença de inibidores da reação (EDWARDS e LOGAN, 2009), manuseio e armazenamento de amostras, *primers*, sondas e enzimas (DIONISI et al., 2003). Com amostras de alimentos, a atenção especial deve ser dada à possível presença de inibidores, e à eficiência de extração de DNA. Um conhecimento microbiológico profundo do alimento em questão, incluindo a sua microbiota habitual e potenciais contaminantes, são também pré-requisitos. Uma vez decidido qual micro-organismo será detectado, os genes-alvo e um par de *primer* específico para reconhecê-lo deve ser selecionado e desenhado. A seleção do gene-alvo é de grande importância. Um gene altamente conservado entre espécies diferentes podem ser usado como estratégia para uma ampla base de detecção, entretanto, se a sequência de DNA usada for única para uma determinada espécie, fornecerá um teste altamente específico (HANNA et al., 2005). Sondas, *primers* e as condições de PCR deve ser otimizados, não apenas para um baixo limite de detecção (sensibilidade), mas também para uma alta eficiência da reação. A concentração ideal de cada um dos oligonucleotídeos usados no ensaio também deve ser otimizada. A quantidade de DNA polimerase acrescentada também é importante; pouca quantidade da enzima pode levar a amplificação ineficiente e uma perda de sensibilidade (EDWARDS e LOGAN, 2009). Idealmente, cada amostra deve

ser diluída serialmente e testada em duplicata e a qPCR deve ser executada para determinar se algum inibidor está presente. No entanto, a melhor alternativa para isso é a incorporação de um IAC (LEVIN, 2004).

As características da PCR em tempo real possibilitam a eliminação da etapa laboriosa pós-amplificação (preparo do gel para eletroforese), convencionalmente necessária para visualização do produto amplificado. Desta forma, pode-se observar que as vantagens da PCR em tempo real em relação à PCR convencional e aos métodos tradicionais de análises de patógenos são inúmeras e incluem, rapidez na obtenção dos resultados, reprodutibilidade e capacidade quantitativa. Além disso, é economicamente viável e o número de micro-organismos e o nível em que eles podem ser identificados (gênero, espécie ou sorotipo) estão se expandindo (GAMMON et al., 2007; YANG e ROTHMAN, 2004). Os métodos baseados em qPCR servem não só para detectar micro-organismos contaminantes e patogênicos, mas também para evitar perdas econômicas devido a falsos positivos. Além disso, testes com base em meios de cultura seletivos, muitas vezes não conseguem detectar certas cepas dentro da população-alvo, resultando na subestimação dos números (JUSTÉ et al., 2008).

Apesar da alta sensibilidade dos métodos qPCR e mPCR, a concentração de micro-organismos em amostras de alimentos pode estar abaixo do limite de detecção. Um enriquecimento anterior é, portanto, comumente necessário, especialmente se o micro-organismo tem que estar ausente (HANNA et al., 2005). No entanto, os tempos de enriquecimento para qPCR são mais curtos do que com outros métodos, devido à maior sensibilidade da técnica (MARTÍN et al., 2010). Apesar destas vantagens, ainda existem reservas quanto a seu uso rotineiro na análise de alimentos. Certamente, a sua introdução plena na indústria de alimentos vai exigir a disponibilidade de forma adequada de pessoal treinado, a adaptação dos protocolos descritos na literatura científica para a prática cotidiana de análises laboratoriais, e da disponibilidade de reagentes na forma de kits a um preço razoável (principalmente se qPCR for usado por laboratórios de processamento de um pequeno número de amostras). Até a data, vários kits comerciais foram desenvolvidos para a detecção dos principais agentes patogênicos de origem alimentar. A maioria dos desafios técnicos encontrados na utilização qPCR com matrizes alimentares foram superados (HANNA et al, 2005; LEVIN, 2004). No entanto, comparado com seu uso em testes clínicos qPCR e a mPCR, para a detecção de micro-organismos ainda está nos primórdios. O principal desafio é testar os diversos tipos de alimentos e o fato de que muitos contêm inibidores de PCR. A presença de inibidores deve ser cuidadosamente verificada para garantir a quantificação precisa dos micro-organismos alvo. Um dos principais inconvenientes que a

indústria de alimentos encontra ao tentar utilizar tecnologias qPCR é que a maioria dos métodos disponíveis não foi adaptado às normas *International Organization for Standardization* (ISO) ou *American Public Health Association* (APHA). É de importância vital para a expansão do uso de qPCR e mPCR na indústria de alimentos que ambos os métodos, de extração de ácidos nucleicos, de quantificação e de multiplexação, sejam validados e padronizados. Entretanto, não podemos considerar a técnica de PCR em tempo real, ou outra técnica molecular qualquer que seja uma substituta das técnicas convencionais de microbiologia. Porém, as razões pelas quais esta técnica deve ser aplicada, tal qual como qualquer outra técnica molecular são a simplicidade, processamento, custo e rapidez. O processo de quantificação qPCR poderia servir para ajudar a construir modelos de previsão de crescimento microbiano. Estes poderiam ser muito útil na elaboração de protocolos de detecção quantitativa, Sistemas HACCP, e ajudar previsão de vida útil (GRAM e DALGAWRD, 2002). A metodologia clássica necessita de menos técnica que um PCR, mas esta última, além de fácil aprendizagem requer menos tempo para adquirir as competências necessárias. Na microbiologia clássica, para se atingir as devidas competências e corretas interpretações são necessários muito treino, experiência e conhecimentos prévios em microbiologia (ALTEKRUSE et al., 1998).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Leite e Derivados da Epamig/Instituto de Laticínios Cândido Tostes e no Laboratório de Genética Molecular Dr. Mario Luiz Martinez da Embrapa Gado de Leite, ambos em Juiz de Fora, MG. O experimento compreendeu duas fases distintas:

- 1ª fase: Foi realizada a caracterização microbiológica de derivados lácteos (leite condensado, doce de leite e queijo Minas Padrão) utilizando a metodologia tradicional;
- 2ª fase: Foi feita a padronização de reações *multiplex* utilizando a técnica PCR em tempo real para detecção dos patógenos *S. enterica* var *Thyphimurium*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7.

4.1 Caracterização microbiológica dos derivados lácteos por metodologia clássica

4.1.1 Amostragem

As amostras foram coletadas em supermercados de Juiz de Fora (MG) e também diretamente nas indústrias processadoras. Foram analisados três lotes distintos de dez marcas nacionais de leite condensado, oito marcas nacionais de doce de leite e sete marcas nacionais de queijo Minas Padrão, produzidos em diferentes Estados do Brasil, perfazendo um total de 30, 24 e 21 amostras, respectivamente. As amostras de doce de leite e leite condensado foram analisadas com no máximo 3 meses de fabricação e as amostras de queijo Minas Padrão com 20±2 dias de fabricação. Os deterioradores e patógenos pesquisados nos produtos foram: mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, coliformes a 30°C e a 45°C, *Staphylococcus* spp. coagulase positiva e negativa, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*.

4.1.2 Preparo das amostras

As amostras de queijo Minas Padrão, leite condensado e doce de leite foram codificadas por letras de acordo com a marca e os lotes. Após a identificação de todas as amostras, preparou-se a capela de segurança microbiológica classe II (ESCO Micro Pte Ltda., Singapura) para a realização de todas as etapas das análises. A capela foi sanitizada com algodão embebido em álcool 70% (v/v) e exposta a 15 minutos de luz ultra violeta de 260 nm de comprimento de onda. Sanitizou-se as embalagens com algodão embebido em álcool 70% GL e após abertura das mesmas, homogeneizou-se com o auxílio de espátulas estéreis. Todos os meios de cultura utilizados foram fabricados pela Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha).

Pesou-se 25 g de amostra em sacos estéreis e adicionou-se 225 mL do diluente estéril (água peptonada: 0,1g/100 mL) e homogeneizou-se vigorosamente em *Stomacher* Modelo LS 190 IN (*Logen Scientific*[®], Brasil). Esta foi a diluição 1/10 ou 10⁻¹, a partir da qual, retirou-se uma alíquota de 1 mL e passou-se para um novo tubo contendo 9 mL de diluente, fazendo-se assim a diluição 10⁻² e assim sucessivamente até a diluição 10⁻⁵. Feitas as diluições, partiu-se para a execução das seguintes análises: contagem padrão em placas de mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, coliformes a 30°C e a 45°C, *Staphylococcus* spp. coagulase positiva e negativa, e pesquisa de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes*. Todas as análises foram feitas em duplicatas.

4.1.3 Contagem padrão em placas de mesófilos aeróbios

Utilizou-se metodologia segundo *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (LAIRD et al., 2004). Transferiu-se 0,1 mL de cada diluição para a superfície de placas de Petri estéreis contendo aproximadamente 15 mL de *Plate Count Agar*. Espalhou-se o inóculo por toda a superfície do meio, com uma alça de Drigalski e, após, incubou-se as placas invertidas a 32°C por 48 h. Selecionou-se as placas com 25 a 250 colônias e efetuou-se a contagem direta das mesmas. Calculou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro da amostra, multiplicando-se o número de colônias em cada placa pelo fator de diluição.

4.1.4 Contagem padrão em placas de bolores e leveduras

A metodologia utilizada foi a descrita em *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (FRANK e YOUSEF, 2004). Transferiu-se 0,1 mL de cada diluição para a superfície de placas de Petri estéreis contendo aproximadamente 15 mL de *Potato Dextrose Agar*, acidificado até pH em torno de 3,5 com uma solução aquosa de ácido tartárico a 10% (m/v). Espalhou-se o inóculo por toda a superfície do meio, com uma alça de Drigalski e, após, incubou-se as placas invertidas a 25°C por 3 a 5 dias. Acompanhou-se o crescimento das colônias durante este período e efetuou-se a contagem antes que as mesmas unissem umas as outras. Selecionou-se as placas com 10 a 100 colônias e efetuou-se a contagem. Calculou-se o número de UFC por mililitro da amostra, multiplicando-se o número de colônias em cada placa pelo fator de diluição.

4.1.5 Coliformes a 30°C

4.1.5.1 Por tubos múltiplos

Seguiu-se a metodologia proposta pela *American Public Health Association* (APHA) incluídas as recomendações do *Standard Methods for the Dairy Products* (DAVIDSON et al., 2004) para as análises de leite condensado e doce de leite. Selecionou-se três diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e foi inoculado 1 mL de cada diluição em uma série de três tubos contendo 10 mL de Caldo Lauril de Sulfato estéril e após, os tubos foram incubados a 35°C por 24 h. Em caso

negativo (ausência de crescimento e/ou produção de gás), os tubos foram reincubados até completar 48 h e foi feita uma nova leitura. Em caso positivo (crescimento e produção de gás), foi transferida uma alçada de cada cultura para tubos contendo *Brilliant-green Bile Lactose Broth* e esses tubos foram incubados a 35°C por 24 h. Após este período foi observado se havia produção de gás. Em caso negativo (ausência de crescimento e/ou produção de gás), os tubos foram reincubados até completar 48 h e a leitura foi feita. Anotou-se o número de tubos com produção de gás e determinou-se o Número Mais Provável (NMP)/g usando uma tabela de NMP (Anexo 1).

4.1.5.2 Por placas

Para as análises das amostras de queijo Minas Padrão utilizou-se a metodologia preconizada pela APHA incluídas as recomendações do *Standard Methods for the Dairy Products* (DAVIDSON et al., 2004). Inoculou-se 1 mL de cada diluição da amostra em placas de Petri estéreis. Verteu-se o Agar Violeta de Cristal-Vermelho Neutro-Bile. Após a homogeneização e solidificação do mesmo, cobriu-se com uma sobre-camada do mesmo meio. Incubou-se a 32°C por 24 h. Contou-se apenas as colônias vermelho púrpuras, com 0,5 mm ou mais em diâmetro, rodeadas por um halo avermelhado de precipitação de sais biliares. Determinou-se o número de UFC/g multiplicando-se o número de colônias típicas pelo inverso do fator de diluição. Em caso de colônias duvidosas, estas são confirmadas transferindo-se uma alçada de cada colônia suspeita para tubos de caldo *Brilliant-green Bile Lactose* e estes são incubados a 32°C por 48 h. Os tubos que apresentaram produção de gás e ausência de película superficial foram considerados positivos. Nos casos em que houve produção de gás e película superficial, submeteu-se a cultura à coloração de Gram e teste de oxidase, considerando como coliformes totais todas as culturas de bastonetes Gram negativos e oxidase negativos.

4.1.6 Coliformes a 45°C

4.1.6.1 A partir de coliformes a 30°C feito por tubos múltiplos

Foi utilizada a metodologia indicada pela APHA para as amostras de leite condensado e doce de leite. A partir dos tubos contendo Caldo Lauril Sulfato com presença de gás, transferiu-se uma alçada de cada cultura para o Caldo *Escherichia coli* (EC) e estes foram

incubados em banho-maria de circulação NT-248 (Novatécnica, Piracicaba, Brasil) a 45,5°C por 24 h. Após a incubação, examinou-se os tubos para a formação de gás e foi determinado o Número Mais Provável (NMP)/g usando uma tabela de NMP (Anexo 1).

4.1.6.2 A partir de coliformes a 30°C feito por placas

Foi utilizada a metodologia descrita na Norma 73A:1985 da *International Dairy Federation* (FIL-IDF) para as amostras de queijo Minas Padrão. Testou-se a raiz quadrada do número de colônias típicas de coliformes crescidas no Ágar Violeta de Cristal-Vermelho Neutro-Bile, transferindo-se as colônias para o caldo EC. Os tubos contendo caldo EC foram incubados em banho-maria de circulação a 45,5°C por 24 h. Após a incubação, os tubos foram examinados para a formação de gás (confirmação). O número de UFC/g foi determinado utilizando a expressão 1.

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{colônias típicas} \times \text{fator de diluição} \times \text{colônias confirmadas}}{\text{colônias isoladas para teste}} \quad (1)$$

4.1.7 *Staphylococcus* spp. coagulase positiva e negativa

Seguiu-se a metodologia proposta pela APHA, incluídas as recomendações do *Standard Methods for the Dairy Products* (HENNING et al., 2004) com adaptações. Inoculou-se 0,1 mL de diluições selecionadas da amostra (leite condensado, doce de leite e queijo Minas Padrão) em placas contendo Ágar Baird Parker, adicionado de 5% (m/v) de emulsão de telurito-gema de ovo a 20% (m/v). Foram inoculados 0,1 mL de cada diluição na superfície do meio de cultura. O inóculo foi espalhado com alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 36°C por 48 h. Após a incubação, as colônias típicas (pretas ou cinza escuras, com 2 mm a 3 mm de diâmetro, lisas, convexas, com bordas perfeitas, rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente) foram contadas e quando as placas apresentaram colônias suspeitas (cinzentas, sem um ou ambos os halos), estas foram contadas separadamente. As colônias foram transferidas para o teste de confirmação: cinco colônias típicas e/ou atípicas foram transferidas para o *Brain Hert Infusion Broth* (BHI) e incubadas a 36°C por 24 horas. Fez-se então o teste da coagulase. Transferiu-se 0,2 mL de cada cultura em Caldo BHI para tubos de ensaio esterilizados e acrescentou-se 0,5 mL de plasma com EDTA Bactident® coagulase. Os tubos foram incubados a 36°C por 6 h. Examinou-se após 6 horas, a

formação de coágulo. Foi feita também a coloração de Gram para confirmação da morfologia das colônias. Foram consideradas coagulase positivas, as colônias classificadas como cocos em cachos na coloração de Gram e com formação de coágulo firme e organizado no teste da coagulase. As colônias que apresentavam cocos em cachos e ausência de coágulo no teste da coagulase foram classificadas como coagulase negativas. O número de UFC/g foi determinado utilizando a expressão 2.

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{colônias típicas} \times \text{fator de diluição} \times \text{colônias confirmadas}}{\text{colônias isoladas para teste}} \quad (2)$$

4.1.8 *Salmonella* sp.

Para pesquisa de *Salmonella* sp. seguiu-se a metodologia proposta no *Food and Drug Administration* (FDA), descrito no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) (ANDREWS e HAMMACK, 2007). Vinte e cinco gramas da amostra (leite condensado, doce de leite e queijo Minas Padrão) foram transferidas para 225 mL de Caldo Lactosado (CL). Após homogeneização esta solução ficou na temperatura ambiente por 60 min. Retirou-se 1 mL e o pH foi ajustado o mesmo para 6,8 com NaOH 1mol/L ou HCl 1mol/L. Após este procedimento, o CL foi reincubado a 37°C por 24 h. Transferiu-se 0,1 mL do CL para 10 mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis e 1 mL para 10 mL de Caldo Tetrionato incubando-se o primeiro a 42°C por 24h (em banho com circulação forçada) e o segundo a 37°C por 24 h. Agitou-se os tubos e foram feitas estrias em placas de Ágar Entérico de Hektoen (HE), Ágar Bismuto Sulfito (BS) e Ágar Xilose Lisina Desoxilato (XLD). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. No Ágar HE as colônias típicas de *Salmonella* sp. apresentam coloração azul esverdeadas com ou sem centro negro. No Ágar BS apresentam coloração cinza, com brilho metálico e no Ágar XLD são rosa escuro, com centro preto e uma zona avermelhada levemente transparente ao redor. Selecionou-se pelo menos duas colônias típicas de cada placa para confirmação preliminar. Inoculou-se colônias suspeitas em tubos contendo Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) inclinado, por estrias em profundidade e com o mesmo inóculo, foi feita estria em Ágar Lisina Ferro (LIA) inclinado. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 h. Após este período, observou-se a ocorrência de reação típica de *Salmonella* sp. Em TSI, é observado uma rampa alcalina (vermelha e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H₂S (escurecimento). Em LIA, é visualizado um fundo e rampa alcalinos (roxo e sem

alteração da cor do meio), com ou sem produção de H₂S (escurecimento). As culturas foram submetidas à confirmação definitiva obedecendo aos seguintes critérios (Quadro 2):

Quadro 2 - Critérios a serem adotados para a confirmação definitiva de *Salmonella* sp..

Reação em LIA	Reação em TSI	Continuação
Rampa e fundo alcalinos com ou sem H ₂ S (típica)	Rampa alcalina e fundo ácido com ou sem H ₂ S (típica)	continuar
Rampa e fundo alcalinos com ou sem H ₂ S (típica)	Rampa e fundo ácidos com ou sem H ₂ S (atípica)	continuar
Rampa alcalina e fundo ácido, com ou sem H ₂ S (atípica)	Rampa alcalina e fundo ácido com ou sem H ₂ S (típica)	continuar
Rampa alcalina e fundo ácido, com ou sem H ₂ S (atípica)	Rampa e fundo ácidos (atípica)	descartar

Fonte: SILVA et al., 2010.

Utilizou-se as culturas que apresentaram reação típica no Ágar TSI na realização das provas sorológicas e bioquímicas de confirmação. Para os testes bioquímicos utilizou-se o kit API 20E (BioMeriëux, North Carolina, EUA). Considera-se *Salmonella* sp., culturas identificadas pelo kit e positivas nos testes confirmativos sorológicos flagelar e somático polivalentes. O resultado é dado como presença ou ausência em 25 g.

4.1.9 *Listeria monocytogenes*

Utilizou-se a metodologia recomendada pelo *Food and Drug Administration* (FDA), descrito no BAM (HITCHINS, 2003). Homogeneizou-se 25 g de amostra com 225 mL de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* Tamponado (BLEB), contendo piruvato de sódio, mas sem os agentes seletivos. O BLEB foi incubado a 30°C por 4 h, adicionou-se os agentes seletivos conforme indicação do fabricante. Após reincubação a 30°C até completar 48 h, o caldo incubado foi estriado na superfície do Ágar Oxford (OXA) e este foi incubado a 35°C por 24 h a 48 h. Observou-se se houve desenvolvimento de colônias típicas (esféricas, pretas, rodeadas por um halo preto de hidrólise de esculina). Em caso de colônias típicas, seleciona-se pelo menos cinco colônias de cada placa para confirmação. Estria-se cada colônia em uma placa contendo o Ágar Trypticase de Soja com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) para purificação. Incuba-se a 30°C por 24 h a 48 h. As colônias são observadas usando-se uma fonte forte de luz branca na parte inferior das placas, posicionadas em um ângulo de 45° em relação à fonte de luz. Seleciona-se as colônias azuladas típicas para realização das provas de confirmação. Transfere-se a colônia típica para um tubo com Ágar TSA-YE inclinado e um

tubo contendo Caldo Trypticase de Soja Extrato de Levedura (TSB-YE), incubando-os a 30°C por 24 h. A partir das culturas em tubos de TSA-YE, realiza-se as provas bioquímicas conforme Quadro 3 abaixo.

Quadro 3 - Resultado típico de *L. monocytogenes* nas provas bioquímicas.

Provas bioquímicas	<i>L. monocytogenes</i>
Catalase	+
Gram	+
Motilidade	+
Hemólise	+
Fermentação da dextrose	+
Fermentação da xilose	-
Fermentação da rhamnose	+
Fermentação do manitol	-
Fermentação da maltose	+
Hidrólise da esculina	+

O resultado é dado como presença ou ausência de *L. monocytogenes* em 25 g.

4.2 Padronização de reações *multiplex* utilizando a técnica PCR em tempo real

Esta parte experimental do trabalho compreendeu três etapas:

- 1ª etapa: Extração e quantificação de DNA de cepas padrões de *S. enterica* var Thyphimurium, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes*;
- 2ª etapa: Padronização das reações *monoplex*;
- 3ª etapa: Padronização das reações *multiplex* para a detecção de *S. enterica* var Thyphimurium e *S. aureus* (*Multiplex* 1) e de *E. coli* O157:H7 com *L. monocytogenes* (*Multiplex* 2).

4.2.1 Cepas

Foram utilizadas seguintes cepas padrão:

- *Salmonella enterica* var Thyphimurium IAL 1472,
- *Staphylococcus aureus* ATCC 51651,
- *Escherichia coli* O157:H7 IAL 1848,
- *Listeria monocytogenes* ATCC 19117.

As cepas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite. Estas culturas congeladas foram primeiramente ativadas, semeadas em placas de Petri contendo BHI, sendo em seguida incubadas a 35°C por 24 h, exceto *L. monocytogenes* que foi incubada a 30°C por 24 h.

4.2.2 Extração de DNA

Uma colônia de cada bactéria isolada em Ágar BHI foi cultivada em 5 mL de Caldo BHI e incubada a 30°C (*L. monocytogenes*) e 35°C (demais bactérias) por 18 h. Após a incubação, o DNA de cada bactéria foi extraído, utilizando-se o kit *Dneasy Blood & Tissue* da Qiagen, Hilden, Germany (o kit contém coluna DNeasy Mini Spin, Tampões AL, ATL, AW1, AW2 e AE, proteinase K) conforme recomendação do fabricante. Abaixo segue a descrição da metodologia.

Para a extração de DNA das cepas padrão, 2 mL do cultivo em Caldo BHI foi centrifugado a 5000 x g durante 10 min e o sobrenadante foi descartado. Para extrair o DNA das bactérias Gram positivas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*), ressuspendeu-se o pelete bacteriano em 180 µL de tampão de lise enzimática (Tris-HCl pH 8,0 1,0 M, EDTA pH 8,0 0,5 M, Triton X-100) e 20 µL de lisozima (20 mg/mL). Incubou-se a 37°C por 30 min e após, adicionou-se 25 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 200 µL de tampão AL. Após homogeneizar em vórtex, incubou-se a 56°C por 30 min. Para extrair o DNA das bactérias Gram negativas, ressuspendeu-se o pelete bacteriano em 180 µL de tampão ATL. Adicionou-se 20 µL de proteinase K, homogeneizou-se em vórtex e o microtubo foi incubado a 56°C por 1 h. Adicionou-se 200 µL de tampão AL e a mistura foi homogeneizada. Os procedimentos a seguir foram os mesmos tanto para as bactérias Gram positivas quanto para as Gram negativas.

Adicionou-se 200 µL de etanol absoluto. Após homogeneizar em vórtex, transferiu-se a mistura para a coluna *DNeasy Mini spin* e esta foi centrifugada a 8000 x g por 1 min. Descartou-se o efluxo e colocou-se a coluna em novo tubo coletor, adicionando-se sobre a mesma 500 µL do tampão AW1. Após nova centrifugação a 8000 x g por 1 min, descartou-se o efluxo e a coluna foi colocada em novo tubo coletor, adicionando-se sobre a mesma 500 µL do tampão AW2. Centrifugou-se a 20000 x g por 3 min, o efluxo foi descartado e a coluna foi encaixada em um novo tubo coletor, momento em que foi adicionado 110 µL de tampão AE. O microtubo contendo a mistura foi incubado a temperatura ambiente por 1 min e após centrifugado a 8000 x g por 1 min, o eluído foi transferido para a coluna novamente repetindo

a centrifugação. Após, descartou-se a coluna. Em seguida, o DNA foi imediatamente quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop* ND-1000 (*NanoDrop Technologies*, Wilmington, DE, EUA) a 260 nm e logo após, as amostras foram estocadas a -20°C até o momento do uso, quando se ajustou as concentrações de DNA.

4.2.3 PCR em Tempo Real

Os *primers* e sondas utilizados neste trabalho foram desenhados segundo indicações de literatura (Tabela 2). Todos os *primers* foram sintetizados pela IDT *Integrate DNA Technologies* (Coralville, Iowa, EUA), e as sondas pela *Applied Biosystems*™ - *by Life Technologies*™ (Foster City, CA, USA).

Primeiramente foram realizadas reações *monoplex*, onde se avaliou a eficiência de amplificação de cada bactéria e do Controle Interno de Amplificação (IAC) em separado e, posteriormente, foram feitas as reações *multiplex*, nas quais se avaliou a amplificação de duas bactérias simultaneamente.

4.2.4 Padronização da PCR monoplex em tempo real para *Salmonella enterica* var *Thyphimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e IAC

Para uma mistura final de reação de 25 µL, utilizou-se *TaqMan Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*™ – *by Life Technologies*™) na concentração de 1X (a *TaqMan* é fornecida em uma concentração 2X e contém DNA polimerase *AmpliTaq Gold*, *AmpErase*® uracil-N-glycosylase - UNG, dNTPs com dUTP, referência passiva - ROX e tampão), 300 nM de sonda, diferentes concentrações de *primer* e quantidades de DNA (Tabela 3). No controle negativo foi adicionado todos os componentes da reação exceto o DNA.

Tabela 2 - Sequencia dos *primers* e sondas utilizados no experimento.

Espécie-alvo	Seqüência do primer (5' - 3') e da sonda	Referência
<i>S. enterica</i>	F: ATAWATCCGGCGGCCTGATG	PIKNOVÁ et al. (2005)
	R: TGGTATCGACGCCTTTATCTGAGA	
	VIC-TTACACCGGAGTGGATTAWACGGCTGGG-MGB	
<i>S. aureus</i>	F: TGTAGTTTCAWGTCTAWGTAGCTCAGCAW	SHORTLE, 1983
	R: TGCACTATATACTGTTGGATCTTCAGAW	
	FAM-TGCATCACAWACAGATAWCGGCGTAWATAGAWG-MGB	
<i>E. coli</i> O157:H7	F: TTGACCCACACTTTGCCGTAW	WANG et al. (2007)
	R: GCGAWAWCTGTGGAWTTGGG	
	FAM-TGACCGCATCGAWACGCAGCT-MGB	
<i>L. monocytogenes</i>	F: CAWAGCGAGAWTGTGGCTATAWATGA	ORAVCOVÁ et al. (2006)
	R: TAWTTTCCGCTGCGCTATCCG	
	VIC-ACCCTGGATGACGACGCTCCACT-MGB	
IAC	F: GCAGCCACTGGTAWCAGGAT	FRICKER et al. (2007)
	R: GCAGAGCGCAGATACCAWAT	
	NED-AGAGCGAGGTATGTATGTAGGCGG-MGB	

Tabela 3 - Concentrações de *primers* e DNA testadas nas reações *monoplex*.

<i>Monoplex</i>	Concentração de <i>primer</i> (nM)	Quantidade de DNA por reação	Concentração de sonda (nM)
<i>S. enterica</i>	50, 100, 200, 300, 400, 500	50, 100, 200, 250 ng	300
<i>S. aureus</i>	50, 100, 200, 300, 400, 500	50, 100, 200, 250 ng	300
<i>E. coli</i> O157:H7	50, 100, 200, 300, 400, 500	50, 100, 200, 250 ng	300
<i>L. monocytogenes</i>	50, 100, 200, 300, 400, 500	50, 100, 200, 250 ng	300
IAC	50, 100, 200, 300, 400, 500	1, 5, 10, 20, 25, 40, 50 pg, 2, 10 ng	300

As condições de termociclagem da PCR em tempo real foram as mesmas para todo o experimento (Quadro 4).

Quadro 4 - Condições da PCR em tempo real

Termociclagem		
		40 ciclos
50°C - 2 min	95°C - 10 min	95°C - 0,5 min
		60°C - 1 min

Cada amostra foi feita em duplicata em placas ópticas de reação de 96 poços, seladas com filme adesivo óptico e amplificadas no equipamento *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados obtidos durante a reação foram computados como valores de Ct e exportados em planilhas do tipo Excel.

Após avaliadas as eficiências das reações *monoplex* pela expressão 3 e estabelecidas as concentrações ótimas de *primers*, sondas e DNA, prosseguiu-se para padronização de reações *multiplex* PCR em tempo real.

$$E = (10^{-1/\text{slope de uma curva padrão}} - 1) \times 100 \quad (3)$$

4.2.5 Padronização da PCR multiplex em tempo real

Definidas as concentrações ótimas de *primers* e a quantidade de DNA nas reações *monoplex*, prosseguiu-se com as reações *multiplex* (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentrações de *primers* e DNA utilizadas nas reações *multiplex*.

Multiplex	Micro-organismo Alvo	Concentração de <i>primer</i> (nM)	Quantidade de DNA (ng/reação)	Concentração de sonda (nM)
1	<i>S. enterica</i>	50	200	300
	<i>S. aureus</i>	100	50	300
2	<i>E. coli</i> O157:H7	200	50	300
	<i>L. monocytogenes</i>	100	100	300
1 e 2	IAC	200	2	300

As condições de termociclagem e volume das reações foram as mesmas das reações *monoplex*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil microbiológico dos derivados lácteos

5.1.1 Doce de leite

Das oito marcas analisadas no presente trabalho, perfazendo um total de 24 amostras (três lotes distintos), 2 entre as 8 marcas (25%) apresentaram contaminação por micro-organismos mesófilos aeróbios e 1 entre 8 marcas (12,5%) apresentou além de micro-organismos mesófilos aeróbios, leveduras e *Staphylococcus* spp. coagulase negativa. Os resultados da contagem média de micro-organismos encontrados nas amostras de doce de leite analisados são mostrados na Tabela 5.

A média da contagem de micro-organismos mesófilos encontrados nas marcas D e E foram de $2,8 \times 10^2$ UFC/g e $6,8 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente. As bactérias mesófilas multiplicam-se rapidamente em temperatura ambiente (temperatura em que o doce de leite é estocado) e nessas condições fermentam a lactose produzindo ácido láctico e outros ácidos orgânicos. A marca E apresentou além de alta contagem de mesófilos aeróbios, alta contagem de leveduras ($2,9 \times 10^5$ UFC/g) e de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa ($1,4 \times 10^6$ UFC/g). Estes resultados corroboram com os resultados encontrados por Sousa e colaboradores (2002) que analisaram 18 amostras de doces de leite produzidos a partir de leite de búfala na Ilha de Marajó no Brasil e isolaram bolores e leveduras em 22,2% das amostras, com contagens de até 3,9 Log UFC/g, mas, não encontraram *Salmonella* sp. e nem *S. aureus*. Timm et al. (2007) analisaram 28 amostras de doce de leite fracionados em porções, para serem vendidos a granel, em supermercados na cidade de Pelotas-RS e apenas uma amostra apresentou contagem de bolores e leveduras com valores aceitáveis pelas normas brasileiras.

Tabela 5 - Perfil microbiológico de amostras de doce de leite (N de amostras = 3; N de lotes distintos = 3).

Marca	Mesófilos aeróbios (UFC/g)	Coliformes a 30°C (NMP/g)	Coliformes a 45°C (NMP/g)	Bolores e Leveduras (UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativa (UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positiva (UFC/g)	<i>Salmonella</i> sp. em 25g	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> em 25g
A	< 1,0 x 10 ¹	< 3,0	< 3,0	< 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência
B	< 1,0 x 10 ¹	< 3,0	< 3,0	< 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência
C	< 1,0 x 10 ¹	< 3,0	< 3,0	< 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência
D	2,8 x 10 ²	< 3,0	< 3,0	< 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência
E	6,8 x 10 ⁵	< 3,0	< 3,0	2,9 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁶	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência
F	< 1,0 x 10 ¹	< 3,0	< 3,0	< 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência
G	< 1,0 x 10 ¹	< 3,0	< 3,0	< 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência
H	< 1,0 x 10 ¹	< 3,0	< 3,0	< 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência

Nota: Os valores da tabela representam a média da contagem nos 3 lotes analisados.

Todas as demais apresentaram contagens acima dos limites estabelecidos pela legislação (Quadro 1). Bolores e leveduras são importantes indicadores da eficiência de práticas de sanitização de ambientes, equipamentos e utensílios durante a produção e beneficiamento de alimentos. Além disso, podem estar associados à produção de metabólitos tóxicos e deterioração de alimentos (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Segundo Evangelista (1994), as leveduras podem alterar muitos produtos lácteos, como queijo, manteiga, doces e leites condensados, por sua ação sobre a lactose, resultando na produção de CO₂, originando um mau odor pelo processo fermentativo além de estufamento da embalagem. Várias espécies de leveduras aparecem deteriorando produtos concentrados açucarados, mas, a ocorrência de espécies patogênicas de leveduras em alimentos é praticamente desconhecida.

Nas amostras de doce de leite analisadas neste estudo, não foram encontrados coliformes a 30°C e a 45°C, *Salmonella* sp., *L. monocytogenes* e *Staphylococcus* spp. coagulase positiva. Entretanto, a possibilidade da presença de patógenos em doce de leite não pode ser descartada. No estudo citado anteriormente, Timm e colaboradores (2007) isolaram além de bolores e leveduras, *Salmonella enterica* var *Thiphymurium* de uma das 28 amostras de doce de leite de búfala e concluiu que o doce de leite pastoso fracionado nos estabelecimentos comerciais, pode ser fonte de micro-organismos patogênicos para humanos, o que justifica a adoção de rigoroso controle na inspeção e fiscalização do comércio deste alimento. Em um estudo com doce de leite artificialmente inoculados, Hentges et al. (2010) recuperaram *L. monocytogenes*, *S. enterica* var *Thyphimurium*, *E. coli* O157:H7 e *S. aureus* após 30, 30, 5 e 10 dias de inoculação, respectivamente. Considerando-se que no processamento do doce de leite, há um aquecimento prolongado do produto, os resultados das marcas D e E neste estudo podem revelar falhas na higienização de equipamentos de envase, manipulação excessiva no envase e temperatura inadequada de envase.

A presença de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa em alta contagem ($1,4 \times 10^6$ UFC/g) em uma das marcas (E), serve de alerta às autoridades regulamentadoras, pois, no Brasil, de acordo com os padrões vigentes, pelo MAPA (Quadro 1), a marca E, mesmo apresentando alta contagem de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, estaria reprovada apenas por apresentar bolores e leveduras acima dos limites permitidos. O grupo de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva é considerado o maior causador de intoxicação de origem alimentar. Entretanto, apesar de muitos autores afirmarem que somente as espécies de estafilococos produtoras da enzima coagulase sejam capazes de produzir enterotoxinas (PEREIRA et al., 2001), atualmente, sabe-se que espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase

negativa também são capazes de produzir enterotoxinas (ANUNCIACÃO et al., 1994; CARMO et al., 2002; LAMAITA et al., 2005; ORDEN et al., 1992; RAPINI et al., 2005).

5.1.2 Leite condensado

Das 30 amostras analisadas (três lotes distintos de dez marcas) nenhuma apresentou coliformes a 30°C e a 45°C, *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus* spp. coagulase positiva. Na Tabela 6 são apresentados os valores para bactérias mesófilas, leveduras e *Staphylococcus* spp. coagulase negativa encontrados nas marcas de leite condensado analisadas. Pelos dados encontrados, observou-se uma elevada contagem global de bactérias mesófilas (até $5,0 \times 10^5$ UFC/g) e *Staphylococcus* spp. coagulase negativa (até $4,5 \times 10^5$ UFC/g) nas marcas analisadas e $1,3 \times 10^2$ UFC/g de leveduras em uma das marcas.

A contagem padrão em placas logo após sua fabricação é utilizada como indicador da qualidade higiênica das instalações, fornecendo também uma noção sobre seu tempo útil de conservação. Segundo Landgraf (2008), mesmo que não haja patógenos, um número elevado de micro-organismos mesófilos indica que o alimento é insalubre (com exceção dos alimentos fermentados) e que houve condição para patógenos se multiplicarem, já que todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas. Na presente pesquisa quantitativa de bactérias mesófilas pode-se notar um grande índice de contaminação em 5 de 10 das marcas analisadas (50%). Considerando-se que os micro-organismos pesquisados podem ser inativados pelo processo de pasteurização, os resultados podem revelar que a higienização dos equipamentos foi deficiente. Os altos índices de contaminação por bactérias mesófilas pode ser explicado pelo fato do produto ser muito viscoso, o que torna difícil sua remoção dos equipamentos de produção e envase, podendo favorecer a formação de biofilmes bacterianos na superfície dos equipamentos, recontaminando assim o produto acabado. MARQUES (2005) relata que a adesão microbiana ocorre devido à deposição de micro-organismos em uma superfície de contato onde se fixam e iniciam o seu desenvolvimento. A formação do biofilme é, conforme citação de CABEÇA (2006), uma estratégia de sobrevivência de micro-organismos em um ambiente com condições adversas o que provoca uma alteração fenotípica de células planctônicas (vida livre) para a forma sésil (aderidas). Quando células existem em um biofilme, elas podem vir a ser 10 - 1.000 vezes mais resistentes aos efeitos de agentes antimicrobianos químicos, como os desinfetantes utilizados por indústrias processadoras de alimentos (BERESFORD et al., 2001). Os biofilmes diminuem a transferência de calor em trocadores de calor, o fluxo em tubulações e principalmente tornam-se fontes de

contaminação microbiana (GERMANO e GERMANO, 2001). Um procedimento efetivo de higienização, em casos de biofilmes precisa solubilizar ou dissolver a matriz de exopolissacarídeo do biofilme, para que o agente sanitizante possa ter acesso às células viáveis (CHMIELEWSKI e FRANK, 2003).

Em relação ao leite e seus derivados, SILVA (2006) enfatiza a dificuldade de remoção dos resíduos destes produtos, pois são resíduos bastante complexos, compostos de substâncias orgânicas (gorduras, proteínas e açúcares) e minerais e que aderem às superfícies dos equipamentos e utensílios de forma bastante resistente. A remoção desses resíduos deve ser realizada imediatamente após o término do uso de equipamentos e realização de operações, para evitar a formação de depósitos persistentes e de difícil remoção. A etapa de microcristalização da lactose, na qual se adiciona lactose microcristalina ao leite condensado, permanecendo a 30°C por tempo prolongado (aproximadamente 4h) é um ponto crítico de controle devido à temperatura que favorece a multiplicação de bactérias mesofílicas. A lactose microcristalina adicionada deve ter excelente qualidade microbiológica para que não recontamine o produto acabado. Os tanques de cristalização possuem grandes dimensões o que dificulta a inspeção visual, sendo indicado testes rápidos de avaliação da limpeza. O envase do leite condensado é outro ponto crítico de controle devido a probabilidade de falhas na higienização do equipamento e a não utilização de envase asséptico por algumas indústrias processadoras. As embalagens devem ser esterilizadas por flambagem, radiação ou banho de peróxido à quente, dependendo do tipo de embalagem utilizada, para garantir a manutenção da qualidade microbiológica do produto acabado.

Staphylococcus spp. coagulase negativa foram encontrados em 4 das 10 marcas analisadas (40%), com contagens de até $4,5 \times 10^5$ UFC/g. Estes resultados corroboram com estudos anteriores do grupo (SÁ et al., 2008; SILVA et al., 2011), em que a contagem de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa isolado de 9 entre 27 amostras de leite condensado (33,3%), foi de até 6,1 Log UFC/g e de 6 entre 9 marcas de leite condensado (70%), foi de até 5,67 Log UFC/g, respectivamente.

Tabela 6 - Perfil microbiológico de amostras de leite condensado (N de amostras = 3; N de lotes distintos = 3).

Marca	Mesófilos aeróbios (UFC/g)	Coliformes a 30°C	Coliformes a 45°C	Bolores e Leveduras (UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativa (UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positiva (UFC/g)	<i>Salmonella</i> sp. em 25g	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> em 25g
A	2,1 x 10 ⁵	< 3,0	< 3,0	<1,0 x 10 ¹	1,8 x 10 ⁵	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência
B	6,8 x 10 ⁴	< 3,0	< 3,0	<1,0 x 10 ¹	5,0 x 10 ⁴	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência
C	<1,0 x 10 ¹	< 3,0	< 3,0	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência
D	<1,0 x 10 ¹	< 3,0	< 3,0	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência
E	1,4 x 10 ⁵	< 3,0	< 3,0	<1,0 x 10 ¹	1,0 x 10 ⁵	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência
F	5,0 x 10 ⁵	< 3,0	< 3,0	<1,0 x 10 ¹	4,5 x 10 ⁵	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência
G	<1,0 x 10 ¹	< 3,0	< 3,0	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência
H	2,0 x 10 ²	< 3,0	< 3,0	1,3 x 10 ²	<1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência
I	<1,0 x 10 ¹	< 3,0	< 3,0	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência
J	<1,0 x 10 ¹	< 3,0	< 3,0	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	ausência	ausência

Nota: Os valores da tabela representam a média da contagem nos 3 lotes analisados.

Considerando que enterotoxinas estafilocócicas podem ser produzidas no alimento em contagens mínimas de 10^3 UFC/g (CARMO et al., 2002), torna-se preocupante os resultados encontrados neste trabalho. A presença de *Staphylococcus* em um alimento se interpreta, em geral, como um indicativo de contaminação a partir da pele, da boca e das fossas nasais dos manipuladores dos alimentos, no entanto equipamentos sujos e as matérias-primas de origem animal podem ser fonte de contaminação.

Quando se encontra um grande número de *Staphylococcus* em um alimento, significa, em geral, que as práticas de limpeza e desinfecção e o controle de temperatura não foram, em algum ponto, adequados. Algumas cepas de *Staphylococcus* spp. são potencialmente formadoras de biofilme antes e após a higienização dos equipamentos, podendo representar um fator de risco de intoxicação para o consumidor. Uma vez constituídos, os biofilmes agem como pontos de contaminação constante, liberando células de micro-organismos patogênicos e/ou deterioradores, podendo comprometer, assim, a qualidade microbiológica de matérias-primas, produtos pré-acabados e acabados (FUSTER-VALLS et al., 2008).

O biofilme estafilocócico pode comprometer a segurança alimentar do alimento, portanto, a contagem desse micro-organismo não deve ser ignorada nas investigações de surtos de toxi-infecções alimentares. A legislação brasileira de lácteos precisa ser revista e atualizada, pois, continua estabelecendo limites apenas para *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, negligenciando o potencial enterotoxigênico de cepas coagulase negativas, assim como a possível presença da toxina termoestável (100°C/30 min) em produtos pasteurizados.

5.1.3 Queijo Minas Padrão

O Queijo Minas Padrão é um produto de grande consumo no Brasil, especialmente no estado de MG, entretanto, não existem na legislação brasileira atual, padrões para sua inspeção microbiológica. Na Tabela 7 são mostradas as contagens médias de micro-organismos dos três lotes das sete marcas de queijos Minas Padrão analisadas neste estudo.

Todas as amostras de queijo Minas Padrão apresentaram mesófilos aeróbios, bolores e leveduras e *Staphylococcus* spp. coagulase negativa com contagens que chegaram a $2,2 \times 10^7$ UFC/g, $1,3 \times 10^7$ UFC/g e $1,0 \times 10^5$ Log UFC/g, respectivamente. As altas contagens de micro-organismos mesófilos pode ser explicada, em parte, pela adição de fermento láctico no leite para a fabricação do queijo Minas Padrão. O elevado número de bolores e leveduras e *Staphylococcus* spp. coagulase negativa em 100% das marcas analisadas sugere que os queijos foram processados sob condições higiênicas insatisfatórias, comprometendo a vida-

de-prateleira do produto (uma vez que bolores e leveduras são potenciais deterioradores de produtos lácticos) e a segurança alimentar dos consumidores, pois, algumas espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa são produtoras de toxina podendo causar intoxicações alimentares.

Staphylococcus spp. coagulase positiva foram encontrados em 57,1% das marcas pesquisadas com contagens de até $8,0 \times 10^3$ UFC/g. Estes resultados corroboram com os resultados encontrados por Melo et al. (2009) em um estudo com 30 amostras de queijo Minas Padrão comercializadas em São Luís (MA), em que as contagens médias de bactérias aeróbias mesófilas encontradas foram de $5,0 \times 10^6$ UFC/g e para os valores obtidos na contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, 6,6% das amostras apresentaram contagens de até $>5,0 \times 10^4$ UFC/g. Arruda et al. (2007), ao pesquisarem a ocorrência de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva em queijos Minas tipos Frescal e Padrão comercializados nas feiras livres de Goiânia (GO), observaram que, para o queijo Minas Padrão, os valores encontrados foram de até $2,0 \times 10^5$ UFC/g e que essa elevada contagem de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva pode representar perigo para o consumidor.

O limite permitido pela legislação para queijos similares ao Minas Padrão é de $1,0 \times 10^3$ UFC/g (BRASIL, 1996). Nestas condições, 28,6% das marcas de queijos Minas Padrão analisadas neste estudo estariam classificadas como produtos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Além disso, concentrações superiores a $1,0 \times 10^3$ UFC/g podem propiciar a produção de enterotoxina (PEREIRA et al., 1991), tornando um alimento nestas condições, um risco potencial à saúde do consumidor.

Coliformes totais (30°C) e termotolerantes (45°C) foram encontrados em 28,6% das marcas analisadas, porém, em baixas contagens, máximo de $1,2 \times 10^3$ UFC/g e $6,0 \times 10^2$ UFC/g, respectivamente, considerando que o queijo é um produto muito manipulado. A reduzida população desses micro-organismos indica baixo nível de contaminação, principalmente de origem fecal ou provável inibição destes devido a produção de ácido láctico pelas bactérias do fermento.

Tabela 7 - Perfil microbiológico de amostras de queijo Minas Padrão (N de amostras = 3; N de lotes distintos = 3).

Marca	Mesófilos aeróbios (UFC/g)	Coliformes a 30°C (UFC/g)	Coliformes a 45°C (UFC/g)	Bolores e Leveduras (UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativa (UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positiva (UFC/g)	<i>Salmonella</i> sp. em 25g	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> em 25g
A	$2,2 \times 10^7$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$2,2 \times 10^4$	$7,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	ausência	ausência
B	$2,1 \times 10^6$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$3,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^5$	$7,5 \times 10^3$	ausência	ausência
C	$1,0 \times 10^6$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$6,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^1$	ausência	ausência
D	$6,0 \times 10^6$	$7,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$2,5 \times 10^2$	$8,0 \times 10^4$	$7,5 \times 10^3$	ausência	ausência
E	$2,3 \times 10^4$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$1,3 \times 10^7$	$1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^1$	ausência	ausência
F	$1,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	$5,9 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	ausência	ausência
G	$2,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$6,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	ausência	ausência

Nota: Os valores da tabela representam a média da contagem nos 3 lotes analisados.

Salmonella sp. e *L. monocytogenes* não foram detectadas em nenhuma das amostras. A presença de bactérias lácticas em queijos Minas Padrão pode ter contribuído para a baixa contagem de coliformes e ausência de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* por exclusão competitiva, além da condição estressante advinda do processamento e estocagem a que o alimento é submetido (FLOWERS *et al.*, 1992 apud ALMEIDA *et al.*, 2003; SHARP, 1981).

5.2 Padronização de reações multiplex PCR em tempo real

Os procedimentos que consomem tempo para identificação de sorotipos de patógenos nos métodos tradicionais podem ser substituídos por uma PCR, que tem sido cada vez mais usada. Essa técnica usada para multiplicar milhões de vezes um único fragmento de DNA em poucas horas, aumenta a sensibilidade e especificidade dos exames, a repetibilidade dos diagnósticos, permitindo um resultado mais rápido que os métodos tradicionais de identificação de micro-organismos. A combinação de dois ou mais pares de *primers* numa mesma reação melhora a eficiência e especificidade de detecção. A concentração de *primers* é um parâmetro crítico para o sucesso da PCR em tempo real. Se todos os *primers* da reação se anelam com igual eficiência, eles podem ser usados na mesma concentração, caso contrário, há que se estabelecer previamente a melhor concentração para cada par de *primer* a ser utilizado.

Neste experimento, variou-se a concentração de *primers* e de DNA bacteriano de cepas padrão e, assim foram padronizadas as reações *monoplex* (Figura 9). Sob as mesmas condições de PCR, vários ensaios foram feitos utilizando-se as cepas padrão de *Salmonella enterica* var Thyphimurium IAL 1472, *Staphylococcus aureus* ATCC 51651, *Escherichia coli* O157:H7 IAL 1848, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117.

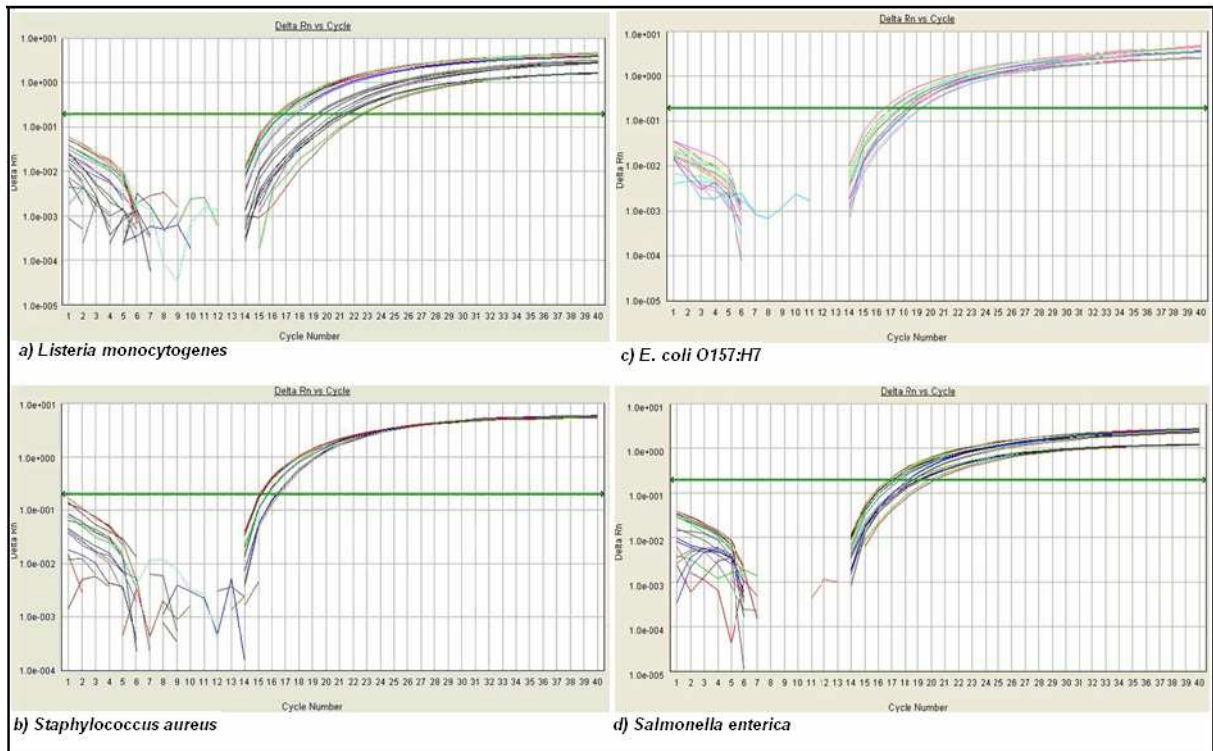


Figura 9 - Perfil de amplificação das reações *monoplex* de PCR em tempo real. a) *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, b) *Staphylococcus aureus* ATCC 51651, c) *Escherichia coli* O157:H7 IAL 1848, d) *Salmonella enterica* var Thyphimurium IAL 1472.

Como mostra a Figura 9, as reações *monoplex* contendo DNA, sonda e o par de *primer* desenhados para cada uma das bactérias, funcionaram bem. A curva de amplificação ultrapassou o limiar de detecção do equipamento (threshold - linha verde) indicando a amplificação dos produtos esperados. Deste modo, após o cálculo da eficiência da reação estabeleceu-se as melhores concentrações de *primer* e DNA para cada bactéria (Tabela 4).

Posteriormente, foram testadas duas reações *multiplex* (*multiplex* 1, misturando os *primers* de IAC, *Salmonella enterica* var Thyphimurium e *S. aureus* e *multiplex* 2, misturando os *primers* de IAC, *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes*), porém, apenas o *multiplex* 1 foi eficiente (Figura 10). Para *multiplex* 2 não foi obtido nenhum produto de amplificação.

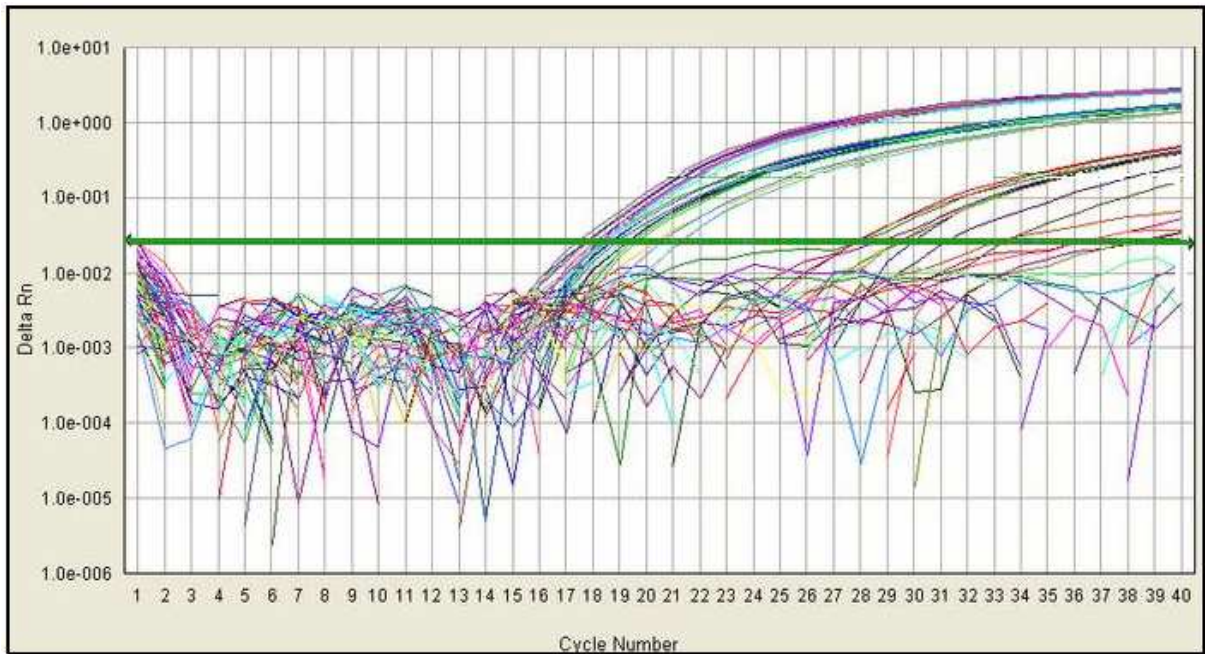


Figura 10 - Perfil de amplificação do *Multiplex 1 - Salmonella enterica/Staphylococcus aureus/IAC*.

Ao se misturar os pares de *primers*, sondas e DNA de *S. enterica*, *S. aureus* e IAC (*multiplex 1*) com o DNA de outras bactérias (*L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7) para testar a especificidade da reação *multiplex*, obteve-se o resultado esperado, pois, somente as espécies-alvo apresentaram produto de amplificação (Tabela 8).

O *multiplex 1* apresentou positividade na amplificação e especificidade na detecção dos patógenos alvo, pois, não houve inibição de amplificação (falso-negativo) e nem amplificação inespecífica (falso-positivo). A repetibilidade dos resultados foi observada uma vez que foram realizadas quatro repetições do *multiplex 1* em duplicata, sob as mesmas condições laboratoriais.

A possibilidade de se amplificar pequenos fragmentos de DNA pela técnica molecular é especialmente importante quando se pesquisa patógenos como *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes*, que podem estar viáveis mas não cultiváveis por terem sofrido algum tipo de injúria celular (pH baixo do meio, baixa atividade de água, tratamento térmico sub-letal). Na metodologia clássica há necessidade de uma etapa de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo da amostra com o objetivo de recuperar as células injuriadas do micro-organismo e inibir a microbiota acompanhante.

Tabela 8 - Amplificação de DNA das bactérias no *multiplex* 1.

Multiplex 1	Alvo (par de <i>primer</i> + sonda presentes na reação)		
	DNA	<i>S. enterica</i>	<i>S. aureus</i>
SAL+PUC 18	+	-	+
AUR+ PUC 18	-	+	+
LIS+ PUC 18	-	-	+
ECO+ PUC 18	-	-	+
SAL+AUR+ PUC 18	+	+	+
SAL+ECO+ PUC 18	+	-	+
SAL+LIS+ PUC 18	+	-	+
AUR+ECO+ PUC 18	-	+	+
AUR+LIS+ PUC 18	-	+	+
LIS+ECO+ PUC 18	-	-	+
SAL+AUR+LIS+ PUC 18	+	+	+
SAL+AUR+ECO+ PUC 18	+	+	+
AUR+LIS+ECO + PUC 18	-	+	+
ECO+ SAL+LIS+ PUC 18	+	-	+
SAL+AUR+ECO+LIS+PUC 18	+	+	+
PUC 18	-	-	+
CN	-	-	-

Nota: (+) amplificou; (-) não amplificou; SAL = *S. enterica*; AUR = *S.aureus*; ECO = *E. coli* O157:H7; LIS = *L. monocytogenes*.

Uma das vantagens da metodologia molecular em relação à clássica é a eliminação destas etapas preliminares de enriquecimento e a alta especificidade das reações, pois, os *primers* e as sondas são desenhados para anelarem em segmentos específicos de DNA dentro de cada espécie. No *multiplex* 1, cepas padrão de *S. aureus* e *Salmonella enterica* var Thyphimurium foram detectados simultaneamente em menos de 24 h (considerando a extração de DNA, diluição e realização da PCR em tempo real. Pela metodologia clássica, para se obter a confirmação da presença destes patógenos levaria 4 e 7 dias, respectivamente.

No *multiplex* 2, contendo os *primers*, sondas e DNA de IAC, *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7, não foi verificada a amplificação dos produtos esperados, mesmo após diversos ensaios de otimização da reação, variando-se as concentrações dos *primers*.

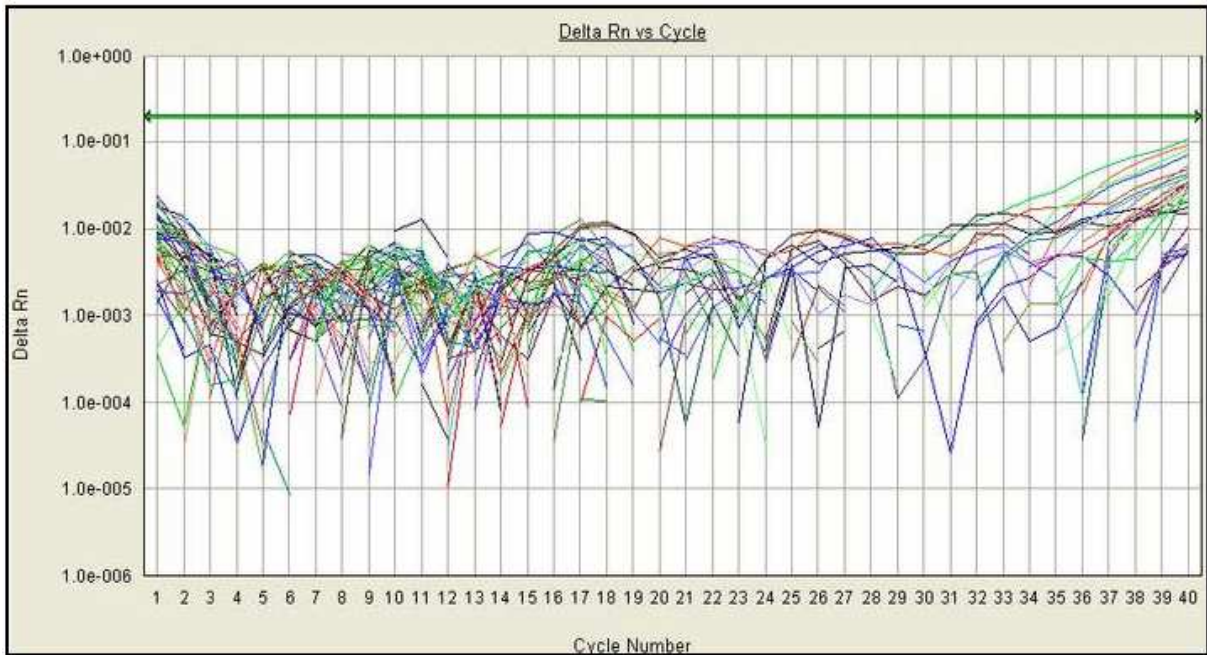


Figura 11 - Perfil de amplificação do *Multiplex 2 - L. monocytogenes/E. coli O157:H7/IAC*.

Assim, um protocolo de PCR *monoplex* para *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* foi estabelecido, entretanto, quando em *multiplex*, os *primers* parecem interagir uns com os outros, inibindo a amplificação. Em um dos ensaios, onde se retirou os primers do IAC para verificar sua interferência na amplificação de *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7, não foram observados produtos de amplificação levando a suposição de que os primers de *L. monocytogenes* inibem a amplificação da *E. coli* O157:H7 e vice-versa.

Em outro ensaio, foram testados os *primers* de *L. monocytogenes* e do IAC em uma reação para verificar a influência dos primers do IAC sobre os primers de *L. monocytogenes*. Verificou-se que os *primers* do IAC e de *L. monocytogenes* interagem entre si inibindo um ao outro.

Realizou-se então uma reação para testar a influência dos *primers* do IAC sobre os *primers* de *E. coli* O157:H7, misturando-se *primers* de ambos e observou-se inibição da amplificação. Em reações *multiplex* pode haver a formação de dímeros de *primers* (estruturas diméricas indesejáveis de anelamento entre os *primers*), com maior força de interação, reduzindo a eficiência da interação dos mesmos com o DNA-alvo. Esta é a maior dificuldade em se trabalhar com reações *multiplex*. Elizaquível e Aznar (2008) apresentaram um PCR *multiplex* em tempo real para a detecção de *E. coli* O157: H7, *Salmonella* spp. e *S. aureus*, usando SYBR Green e posteriormente, *TaqMan*. Ambos foram igualmente sensíveis (10^3 UFC/g) em detectar estes patógenos nas amostras de vegetais minimamente processados

inoculados artificialmente, porém, estes micro-organismos devem estar ausentes em alimentos processados, necessitando portanto, de se otimizar a sensibilidade deste *multiplex*. Suo et al. (2010) em um estudo com carne moída contaminada artificialmente foi capaz de detectar simultaneamente *Salmonella* sp., *Escherichia coli* O157 e *L. monocytogenes* utilizando um *multiplex* PCR em tempo real com uma sensibilidade de detecção <18 UFC/10 g carne moída. Kawasaki et al. (2010) desenvolveram um *multiplex* PCR em tempo real usando sondas fluorescentes para detectar e quantificar *Salmonella* sp, *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 em amostras de carne de porco moída, porém, a sensibilidade de detecção para este método foi de $2,0 \times 10^2$ UFC/mL para cada patógeno. Omiccioli et al. (2009) desenvolveram um *multiplex* PCR em tempo real para a detecção simultânea *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157 no leite cru com inclusividade e exclusividade de 100% cada, com um limite de detecção de 1 UFC/25 mL para cada patógeno. Segundo os autores, o ensaio representa uma abordagem alternativa para a detecção qualitativa das espécies citadas, ajudando na rastreabilidade de várias amostras de leite, reduzindo o tempo de resposta e a carga de trabalho.

6 CONCLUSÕES

- Concluiu-se que os principais micro-organismos contaminantes do doce de leite e do leite condensado são os mesófilos aeróbios, leveduras e *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, comprovando que a baixa atividade de água dos produtos e as intensidades dos tratamentos térmicos não são suficientes para inibir o crescimento destes micro-organismos;
- No queijo Minas Padrão, além de altas contagens de mesófilos aeróbios, também foram encontradas altas contagens de bolores e leveduras e *Staphylococcus* spp. coagulase positiva e negativa, o que reforça a necessidade da criação de um Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade específico para este produto para que auxilie nos programas de qualidade e na formação de profissionais capacitados;
- A elevada contagem de micro-organismos mesófilos, bolores e leveduras e bactérias do gênero *Staphylococcus* detectada nos produtos indica deficiência nos procedimentos de higienização de equipamentos de envase e tanques de microcristalização (no caso de leite condensado) e sugere a necessidade de melhorias higiênico-sanitárias em todo o fluxograma de fabricação destes derivados lácteos;
- Foi padronizada uma reação *multiplex* PCR em tempo real com culturas puras de *Salmonella enterica* var *Thyphimurium* e *Staphylococcus aureus*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na pesquisa bibliográfica não foram encontrados trabalhos que testaram a técnica *multiplex* PCR em tempo real para produtos com as características do leite condensado e do doce de leite. A continuação deste trabalho irá contribuir com a busca por validação da metodologia PCR em tempo real aplicada para derivados lácteos. O próximo passo do nosso grupo de pesquisa será a aplicação do *multiplex* padronizado neste estudo às amostras dos derivados lácteos (leites condensados, doce de leite e queijo Minas Padrão e de Coalho), avaliando sua especificidade e sensibilidade e incluir o uso de EMA (brometo de etídeo monoazida), para impedir a amplificação de DNA de bactérias não viáveis. Novos *primers* para o *multiplex 2* serão desenhados para a padronização deste.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.; MOTARJEMI, Y. **Organização Mundial de saúde/Segurança básica dos alimentos para profissionais da saúde**. São Paulo: Roca, 2002. 128 p.
- ADESIYUM, A. A.; WEBB, J. A.; ROMAIN, H. T. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 629-632, 1998.
- AHMED, E. K.; HUSSEIN, S. Z. Incidence of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk and some pasteurized milk products and effect of boiling on its viability. **Assiut Veterinary Medical Journal**, v. 51, n. 105, p. 89-99, 2005 (Resumo).
- ALAIS, C. **Ciencia de la leche. Principio de técnica lechera**. Barcelona: Editorial Reverte, S. A. 1985.
- ALCOCER, I.; OLIVEIRA, C. R. M. Detecção rápida de *Salmonella enteritidis* em alimentos por ensaio imunoenzimático ELISA. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 401 - 408, 2003.
- ALLMANN, M. HÖFELEIN, C.; KÖPPEL, E.; LÜTHY, J.; MEYER, R.; NIEDERHAUSER, C.; WEGMÜLLER, B.; CANDRIAN, U. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. **Research in Microbiology**, v. 146, p. 85-97, 1995.
- ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in cheese made in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 6, p. 578-580, 2000.
- ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C. Métodos de detecção e mecanismos de virulência de *Listeria monocytogenes*. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 37, n. 2, p. 136-145, 2003.
- ALMEIDA, P. M. P.; FRANCO, R. M. Bacteriological evaluation of Minas frescal cheese for pathogenic organisms of public health importance: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp and faecal coliforms. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 111, p. 79-85, 2003.
- ALTEKRUSE, S. F.; TIMBO, B. B.; MOWBRAY, J. C.; BEAN, N. H.; POTTER, M. E. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 7, p. 709-725, 1998.
- ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. S., 2007. Salmonella. In: Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual Online**, cap. 5, update December 2007. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>>. Acesso em: 28 ago. 2009.
- ANUNCIÇÃO, L. L. C.; LINARDI, W. R.; CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. S. Production of staphylococcal enterotoxin A in white cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 25, p. 257-276, 1994.

APPLIED BIOSYSTEMS. Real Time PCR Systems. **Absolute Quantification Getting Started Guide**. Atlanta, 2005. Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com/realtimeguide>>. Acesso em: 16 ago. 2011.

ARCURI, E. F.; OLIVEIRA, R. C.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C.; BRITO, M. A. Avaliação do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru refrigerado pela detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec*, e *sed* através da PCR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Universidade Federal de Passo Fundo, 2004. p. 1-3.

ARCURI, E. F., ÂNGELO F. F., GUIMARÃES, M. F., TALON, R., BORGES, M. F., LEROY, S. LOISEAU, G., LANGE, C. C., ANDRADE, N. J., MONTET, D. Toxigenic status of *staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and Minas frescal cheese in Brazil. **Journal of food protection**. Dez. 2010, v. 73, n.12, p. 2225-2231.

ARMSTRONG, G. L.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS JUNIOR, J. G. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into food supply of the developed world. **Epidemiologic Reviews**, v. 18, n. 1, p. 29-51, 1996.

ARNOLD, K. W.; KASPER, C. W. Starvation and stationary phase induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2364-2368, 1995.

ARRUDA, M. L. T.; NICOLAU, E. S.; REIS, A. P.; ARAÚJO, A. S.; MESQUITA, A. J. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos Minas tipo frescal e padrão comercializados nas feiras-livres de Goiânia-GO. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.3, p. 292-298, 2007.

ASATO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**, v. 130, p. 33-40, 2003.

ASLAM, M.; HOGAN, J.; SMITH, K.L. Development of a PCR-based assay to detect Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in milk. **Food Microbiology**, v.20, p. 345-350, 2003.

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. **Queijos – Mercado total brasileiro**. Compilado e organizado por Disney Conscione, São Paulo, 2010.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 17. ed., Washington, DC: Association Official Analytical Chemists, v.1. 2002.

BAHK, Y. Y.; KIM, S. A.; KIM, JI-SOO; EUH, HYUNG-JIN; BAI, GIL-HAN; CHO, SANG-NAE; KIM, Y. S. Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, p. 3299-3307, 2004.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P. R.; BARRON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed). **Manual of clinical microbiology**. 8. ed. Washington: ASM Press, 2003. v. 1. p. 384-404.

- BARROS, P. C. O. G.; NOGUEIRA, L. C.; RODRIGUEZ, E. M.; CHIAPPINI, C. C. J. Evaluation of the microbiological quality of Minas Frescal cheese sold in the municipality of Rio de Janeiro, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n. 122, p. 57-61, 2004.
- BARROW, G. I.; FELTHAM, R. K. A. **Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1993, 331p.
- BAUMAN, D.E.; MATHER, I.H.; WALL, R.J.; LOCK, A.L.. Major Advances Associated with the Biosynthesis of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1235-1243, 2006.
- BERESFORD, M. R.; ANDREW, P. W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 6, p. 1000-1005, 2001.
- BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 463 – 523.
- BETTS, G. D. Controlling *E. coli* O157:H7. **Nutrition & Food Science**, v. 30, n. 4, p. 183-186, 2000.
- BEUMER, R. R.; BRINKMAN, E.; ROMBOUTS, F. M. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella* spp.: a comparison with other methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 363 - 374, 1991.
- BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; BLANCO, J.; GONZALEZ E.A.; MORA, A.; PRADO, C.; FERNANDEZ, L.; RIO, M.; RAMOS, J.; ALONSO, M. P. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in health cattle. **Epidemiology and Infection**, v. 117, p. 215-257, 1996.
- BOER, E.; BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 119-130, 1999.
- BOGGS, J. D.; WHITWAN, R. E.; HALE, L. M.; BRISCOE, R. P.; KAHN, S. E.; MACCORMACK, J. N.; MAILLARD, J. M.; GRAYSON, J. D.; SIGMON, K. S.; REARDON, J. W.; SAWH, J. R. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese. North Carolina, October, 2000-January, 2001. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 50, p., 1117-1118, 2001.
- BOOR, K. J. Fluid dairy product quality and safety: looking to the future. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1-11, 2001.
- BOPP, C. A.; BRENNER, F. W.; FIELDS, P. I.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: MURRAY, P. R.; BARRON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed). **Manual of clinical microbiology**. 8. ed. Washington: ASM Press, 2003. v. 1. 1212p.
- BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, E. H. F.; FIGUEIREDO, E. A. T. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 31-40, 2003.

BOTTELDOORN, N.; HEYNDRICKX, M.; RIJSENS, N.; HERMAN, L. Detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* by a VTEC/EHEC multiplex PCR in porcine faeces and pig carcass swabs. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 2, p. 97-104, 2003.

BOTTERO, M.T.; DALMASSO, A.; SOGLIA, D.; ROSATI, S.; DECASTELLI, L.; CIVERA, T. Development of a multiplex PCR assay for the identification of pathogenic genes of *Escherichia coli* in milk and milk products. **Molecular and Cellular Probes**, v.18, p. 283-288, 2004.

BOYCE, M. D.; SWERDLOW, D. L.; GRIFFIN, P. M. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 6, p. 364-368, 1995.

BRADSHAW, J. G.; PEELER, J. T.; CORWIN, J. J.; HUNT, J. M.; TIERNEY, J. T.; LARKIN, E. P.; TWEDT, R. M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. **Journal of Food Protection**, v. 48, n. 9, p. 743-745, 1985.

BRADSHAW, J. G.; PEELER, J. T.; CORWIN, J. J.; BARNETT, J. E.; TWEDT, R. M. Thermal resistance of disease associated *Salmonella* Typhimurium in milk. **Journal of Food Protection**, v. 50, p.95, 1987.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Decreto nº 30.691, de 29/03/52. Brasília: Ministério da Agricultura, 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07/03/96. **Regulamento Técnico Geral para Fixação de Requisitos Microbiológicos de Queijos**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Decreto 2244 de 04 de junho de 1997: **RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília, DF: Riispoa, 1997. Título VII, cap. IV, art. 598 e 614.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa, de 4 de Setembro de 1997. Regulamento Técnico Mercosul para fixação de identidade e qualidade de doce de leite. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 172, 8 set. 1997. Seção 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001, dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, revogando a portaria SVS/MS 451, de 19 de setembro de 1997, publicado no DOU de 2 de julho de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília 2 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01.rdc.htm>. Acesso em: 6 ago. 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde - **Secretaria de Vigilância em Saúde Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar**. 2011. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 21 jan. 2011.

BRECKINRINDGE, J. C.; BERGDOLL, M. S. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin producing *Staphylococcus*. **Medical Intelligence**, The New England, v. 284, n. 10, p. 541-543, 1971.

BRICIO, S. M. L.; SILVA, C. G.; FINGER, R. M. Bacteriological quality of pasteurized type C milk produced in the state of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1-3, p. 124-126, 2005.

BRIGIDO, B. M.; FREITAS, V. P. S.; MAZON, E. M. A.; PISANI, B.; PRNADI, M. A. G.; PASSOS, M. H. C. R. "Minas Frescal" cheese: evaluation of quality and its observance of Brazilian Guidelines. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 2, p. 177-185, 2004.

BRITO, J. R.; SANTOS, E. M. P.; ARCURI, E. F.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; SOUZA, G. N.; CERQUEIRA, M. M. P. O.; BELTRAN, J. M. S.; CALL, J. E.; LIU, Y.; PORTO-FETT, A. C. S.; LUCHANSKY, J. B. Retail survey of Brazilian milk and Minas Frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 74, n.15, p. 4954-4961, Ago. 2008.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

BULA, C. J.; BILLE, J. GLAUSER, M. P. An epidemic of foodborne listeriosis in western Switzerland: description of 57 cases involving adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, p. 66-72, 1995.

CABEÇA, T. K. **Suscetibilidade de microrganismos relacionados com a contaminação de alimentos em biofilme artificial e em suspensão frente a desinfetantes**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2006.

CÂMARA, S. A. V.; AMARAL, G. B.; MULLER, M. T.; SILVEIRA, K. C. S.; ALMEIDA, T. N.; MEDEIRO, C. F. Microbiological evaluation of fresh handmade "Minas" cheese, for sale in the municipal market of Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, p. 32-36, 2002.

CAMPBELL, J.; BANG, W.; ISONHOOD, J.; GERARD, P. D.; DRACK, M. A. Effects of salt, acid, and MSG on cold storage survival and subsequent acid tolerance of *Escherichia coli* O 157:H7. **Food Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 727-735, 2004.

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W. M. C. Quality parameters in commercialized cheeses in the Federal District during the 1997-2001 period. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n. 123, p. 49-53, 2004.

CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 21, p. 320-323, 1990.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; ANUNCIACÃO, L. L. C.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning in Minas Gerais State (Brazil). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, n. 2, p.113-122, 1995.

CARMO, L. S.; VIERIA, C.; REIS, J.; DARC, P. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* present in food implicated in food poisoning. **Revista de Microbiologia**, v. 227, p. 122-125, 1996.

CARMO, L. S. **Produção e purificação das enterotoxinas estafilocócicas A, B, C e D**. 1997. 177p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)-Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, p. 9-14, 2002.

CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo Minas Frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas - SP**. 2003. 107p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION – CDC. **CDC estimate of foodborne illness in the United States**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>>. Acesso em: 06 out. 2011.

CHAMBERLAIN, J. S.; GIBBS, R. A.; RANIER, J. E.; NGUYEN, P. N.; CASKEY, C. T. Detection screening of Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, London, v. 16, p. 11141-11156, 1988.

CHIANG, Y. C.; LIAO, W. W.; FAN, C. M.; PAI, W. Y.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 1, p. 66-73, 2008.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Georgia, v. 2, n. 1, p. 22-32, 2003.

CODY, S. H.; ABBOTT, S. L.; MARFIN, A. A.; SCHULZ, B.; WAGNER, P.; ROBBINS, K.; MOHLE-BOETANI, J. C.; VUGIA, D. J. Two outbreaks of multidrug resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT 104 infections linked to raw-milk cheese in northern California. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 281, n. 19, p. 1805-1810, 1999.

COELHO, E. B. B.; COELHO, D. T.; PINHEIRO, A. J. R.; CHAVES, J. B. P.; PEREIRA, A. S. Utilização de beta_D_galactosidase no controle da cristalização do doce de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, MG, v. 37, n. 221, p. 7-12, 1982.

COIA, J. E. Clinical, microbiology and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 20, p. 01-09, 1998.

CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, M. G. F.; OLIVEIRA, C. Z. F.; NASCIMENTO, E. R. ***Staphylococcus aureus*: importância para a saúde pública e aspectos epidemiológicos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 15p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 114).

CORDEIRO, C. A. M.; CARLOS, L. A.; MARTINS, M. L. L. Microbiological quality of grade C pasteurised milk from small processing factories in Campos dos Goitazes, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 92 / 93, p. 41-44, 2002.

COSTA, F. M. A.; D'ALESSANDRO, W. T.; CARVALHO, A. L.; ROCHA, J. M.; TANEZINI, C. A.; PONTES, I. S.; FERREIRA, M. L.; SOTÉRIO, N. M. F. Variação do teor de gordura no leite bovino cru. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 5, p.763-769, 1992.

CRASS, B. A.; BERGDOLL, M. S. Involvement of coagulase –negative staphylococci in toxic shock syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 23, p. 43-45, 1986.

CURTIS, G. D. W.; BEUCHAT, L. R. Quality control of culture media – perspectives and problems. **International Journal of Food Microbiology**. v. 45, p. 3-6, 1998.

DAHMER, A. M. **Gestão da Qualidade na indústria de leite do Estado de Mato Grosso do Sul**, 2006, 220 p. Dissertação (Mestrado em Agronegócios), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 2006.

DALTON, C. B.; AUSTIN, C. C.; SOBEL, J.; HAYES, P. S.; BIBB, W. F.; GRAVES, L. M. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **New England Journal of Medicine**, v. 336, p. 100-105, 1997.

DAVIDSON, P. M.; ROTH, L. A.; GAMBREL-LENARZ, S. A. Coliform and other indicator bacteria. In: WEHR, H. M. e FRANK, J. F. (Eds.), **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 17 ed. American public Health Association, Washington, D. C., 2004, cap.7, p. 187-226.

DE BUYSER, M. L. D.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 1-17, 2001

DIONISI, H. M.; HARMS, G.; LAYTON, A. C.; GREGORY, I. R.; PARKER, J.; HAWKINS, S. A.; ROBINSON, K. G.; SAYLER, G. S. (2003). Power analysis for real-time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction. **Applied and Environmental Microbiology**, 69, 6597 e 6604.

DONNELLY, C.W. Concerns of microbial pathogens in association with dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 1656-1661, 1990.

DOYLE, M. P. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, v. 42, p. 169-171, 1988.

DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, p. 289-302, 1991.

DOYLE, M. P.; ZHAO, T.; MENG, J.; ZHAO, S. *Escherichia coli* O157:H7. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p. 171-191.

DUNCAN, S. E.; HACKNEY, C. R. Relevance of *Escherichia coli* O157:H7 to the dairy industry. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 14, n. 11, p. 656-660, 1994.

EDWARDS, K.; LOGAN, J. Performing real-time PCR. In J. LOGAN; K. EDWARDS; N. SAUNDERS (Eds.). **Real-time PCR. Current technology and applications**. Norfolk. UK: Caister Academic Press, 2009.

ELIZAQUÍVEL, P.; AZNAR, R. A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables. **Food Microbiology**, vol. 25, n. 5, p. 705-713, ago. 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002008000361>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Gado de Leite. Disponível em: <<http://www.cnpgl.embrapa.br/>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

ERKMEN, O. Growth of *Listeria monocytogenes* during manufacture and storage of Colby cheese. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 1201-1205, 1995.

ESTATÍSTICAS DO LEITE. 2008. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2008. Disponível em: <<http://www.cnppl.embrapa.br>>. Acesso em: 25 de jan. de 2010.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2 ed. Rio de Janeiro: ATHENEU, 1994, 652p.

FARAH, S. M. S. S.; DE SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; IRINO, K.; DA SILVA, L. R.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; PIGATTO, C. P.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle, Paraná, Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 22., 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003. Resumo (MV093).

FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; MALCOLM, S. A. The presence of *Listeria* spp. in raw milk in Ontario. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 95-100, 1988a.

FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; SPEIRS, J. I. D' Aoust, J. Y.; EMMONS, D. B. McKELLAR, R. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, p. 277-286, 1988b.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e micro-organismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Aliment**. Campinas, v.23, dez. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=0101-2061&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 02 jan. 2012.

FERNANDEZ, A. T. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos na cidade do Rio de Janeiro. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 111, p. 58-63, 2003.

FIGUEIREDO, E. A. T. **Ocorrência do gênero *Listeria* e avaliação da diversidade genética de *Listeria monocytogenes* através da Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) e sua distribuição em linha de processamento de leite pasteurizado tipo "C"**. 2000. 100p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biomédica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

- FISCHER, A., VON EIFF, C., KUCZIUS, T., OMOE, K., PETERS, G., BECKER, K. (2007). A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Molecular Medicine**, 85, 461-469.
- FLEMING, D. W.; COCHI, S. L.; MacDONALD, K. L.; BRONDUM, J.; HAYES, P. S.; PLIKAYTIS, B. D.; HOLMES, M. B.; AUDURIER, A.; BROOME, C. V.; REINGOLD, A. L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **New England Journal of Medicine**, v. 312, p. 404-407, 1985.
- FRANCO, B. D. G. M. Métodos alternativos de análise microbiológica de alimentos: uma revisão. **Boletim da SBCTA**, v. 33, n.2, p.229-234, jul/dez. 1999.
- FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 1996, p. 46-50.
- FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2004. 182p.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 196p.
- FRANCO, R. M.; ALMEIDA, L. E. F. Avaliação microbiológica de queijo ralado, tipo parmesão, comercializado em Niterói, RJ. **Higiene Alimentar**, v. 6, n. 21, p. 33-36, 1992.
- FRAZIER, W. C. **Microbiologia de los alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 681p.
- FRICKER, M.; MESSELHAUBER, U.; BUSCH, U.; SHERER, S.; EHLING-SCHULZ, M. Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent foodborne outbreaks. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 73, p. 1882-1898, 2007.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.
- FUSTER-VALLS, N.; HERNADEZ-HERRERO, M.; MARÍN-DE-MATEO, M.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**, v. 19, n. 3, p. 308-314, 2008.
- GAMMON, K. S.; LIVENS, S.; PAWLOWSKY, K.; RAWLING, S. J.; CHANDRA, S.; MIDDLETON, A. M. Development of real-time PCR methods for the rapid detection of low concentrations of *Gluconobacter* and *Gluconacetobacter* species in an electrolyte replacement drink. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, 262-267, 2007.
- GANDRA, E. A. **Multiplex PCR para detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado**. 2006. 69f. Tese 16S – *S. warneri* 16S – *S. lugdunensis* (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", UFPel, Pelotas, 2006.
- GEHA, D. J.; UHL, J. R.; GUSTAFERRO, C. A.; PERSING, D. H. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 32, p. 1768-1772, 1994.

GELLIN, B. G.; BROOME, C. V. Listeriosis. **Journal of the American Medical Association**, v. 261, p. 1313, 1989.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. p. 629.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos**. São Paulo: Varela, 2003. 655 p.

GIOMBELLI, A. Método tradicional clássico para detecção de *Salmonella* em alimentos: Um problema técnico bastante complexo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, n.68/69, v.14, jan/fev. p. 58-61, 2000.

GIOMBELLI, A.; LOPES DA SILVA, N. Avaliação do método tradicional para detecção de *Salmonella* spp. em carnes in natura. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16. n. 95, abr. p. 88-91, 2002.

GLASS, K. A.; LOELFELHOTZ, J. M.; FORD, J. P.; DOYLE, M. P. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2513-2516, 1992.

GONZALEZ, A. G. M. COUTINHO, C. A. S.; CERQUEIRA, A. M. F.; GUTH, B. E. C.; SOUZA, R. M.; LIBERAL, M. H. T.; POMBO, C. R. JOAQUIM, R. M.; ANDRADE, J. R. C. Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 and non-O157 isolated from healthy cattle in Rio de Janeiro state, Brazil. . In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 21., 2001, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001. p. 104. Resumo.

GOULET, V.; JACQUET, C.; VAILLANT, V.; REBIERE, I.; MOURET, E.; LORENTE, C.; MAILLOTE, E.; STAINER, F.; ROCOURT, J. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. **The Lancet**, v. 345, p. 1581-1582, 1995.

GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; PAPTAEODOROU, K. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in sour milk, cows' milk yogurt and ewes milk yogurt. **Journal of Dairy Research**, v. 69, p. 655-660, 2002.

GRAM, L.; DALGAWRD, P. Fish spoilage bacteria-problems and solutions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 262-266, 2002.

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemorrhagic uremic syndrome. **Epidemiologic Reviews**, v. 13, p. 60-98, 1991.

GUSMÃO, V. V.; GONÇALVES, T. M. V.; HOFFMAN, F. L. Microbiological quality of pasteurized milk types A, B and C obtained from commercial outlets in the region of São José do Rio Preto, SP. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 137, p. 95, 2005.

HALL, C. W.; HEDRICK, T. I. **Drying of milk products**. 2. ed. Westport, AVI Publishing: 1971. 323p.

HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E.; KINSEL, M. L.; TARR, P. I.; RICE, D. H.; PAROS, M. G. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. **Epidemiology and Infection**, v. 113, p. 199-207, 1994.

HANNA, S. E.; CONNOR, C. J.; WANG, H. H. Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations. **Journal of Food Science**, v.70, p. 49-53, 2005.

HASSAN, L. MOHAMMED, H. O.; McDONOUGH, P. L. Farm-management and milking practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in New York state dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 51, n. 1-2, p. 63-73, 2001.

HENNING, D. R.; FLOWERS, R.; REISER, R.; RYSER, E. T. Pathogens in milk and milk products. In: WEHR, H. M. e FRANK, J. F. (Eds.), **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 17 ed. American public Health Association, Washington, D. C., 2004. Chapter 5, p. 103-151.

HENTGES, D.; SILVA, D. T.; DIAS, P. A.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; ZONTA, M. N.; TIMM, C. D. Pathogenic microorganism survival in dulce de leche. **Food Control**, 21 1291–1293, 2010.

HIGUCHI, R., DOLLINGER, G.; SEAN WALSH, P.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Bio/Technology**, New York, v. 10, n. 4, p. 413-417, Abr.1992.

HITCHINS, A. D. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In: U S Food and Drug Administration (FDA), **Bacteriological Analytical Manual Online**. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>>. Acesso em: 27 dez. 2005.

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R.; GELFAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 88, p. 7276-7280, Ago. 1991.

HOORFAR, J.; MALORNY B.; ABDULMAWJOOD, A.; COOK, N.; WAGNER, M.; FACH, P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1863 - 1868, 2004.

HORTON, L. R. Risk analysis and the law: international law, the World Trade Organization, Codex Alimentarius and national legislation. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, p. 1057-1067, 2001.

HOSKEN, F.S. Doce de leite: durabilidade e cristalização. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v. 24, n. 147, p. 10-17, nov/dez. 1969.

HSU, S. C.; TSEN, H. Y. PCR primers designed from malic acid dehydrogenase gene and their use for detection of *Escherichia coli* in water and milk samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 01-11, 2001.

HUANG, H.; GARCIA, M. M.; BROOKS, B. W.; NIELSEN, K. Evaluation of culture enrichment procedures for use with *Salmonella* detection immunoassay. **International Journal of Food Microbiology**. v. 51, p. 85-94, 1999.

HURD, S.; PHAN, Q.; HADLER, J. Multistate outbreak of listeriosis – United States, 2000. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 49, p. 1129-1130, 2000.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in foods 7. Microbiological testing in foods safety management**, 1. ed., Zaragoza: Acribia, 2002.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (FIL-IDF). Milk IDF and milk products: enumeration of coliforms: colony count technique and most probable number technique at 30°C. In: **Bulletin of International Dairy Federation**, Brussels n.73 A, p.9, 1985.

INGHAM, S. C.; SU, Y. C.; SPANGENBERG, D. S. Survival of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese brines. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 73-79, 2000.

INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS (IFT). **Bacteria associated with foodborne diseases**. Chicago: IFT, 2004. 25p.

JABLONSKI, L. M.; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, cap. 19, p. 353-375, 1997.

JAMES, S. M.; FANNIN, S. L.; AGEE, B. A.; HULL, B.; PARKER, E.; VOGT, J.; RUN, G.; WILLIAMS, J.; LIEB, L.; PRENDERGAST, T.; WERNER, S. B.; CHIN, J. Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese - California. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 34, p. 357-359, 1985.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. Foodborne listeriosis In: **Modern food microbiology**. 7. ed. Nova York: Springer Science Business Media, Inc., 2005. Cap. 25, p. 591 - 618.

JAYARAO, B. M.; HENNING, D. R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2157-2162, 2001.

JENSEN, A.; FREDERIKSEN, W.; GERNER-SMIDT, P. Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989-1990. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 171-178, 1994.

JOHNSON, F. A.; NELSON, J. H.; JOHNSON, M. Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk, part II. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 519-540, 1990.

JUSTÉ, A.; THOMMA, B. P. H. J.; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. **Food Microbiology**, 25, p. 745-761, 2008.

KAWASAKI, S.; FRATAMICO, P. M. ; HORIKOSHI, N.; OKADA, Y.; TAKESHITA, K.; SAMESHIMA, T.; KAWAMOTO, S. Multiplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection and quantification of *Salmonella* species, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in ground pork samples. **Foodborne Pathogens and Disease**, vol. 7, n. 5, p. 549-554, May, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132032>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

KELLS, J.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation.

International Journal of Food Microbiology, v. 91, n. 2, p. 167-174, 2004.

KLERKS, M. M., ZIJLSTRA, C., VAN BRUGGEN, A. H. Comparison of real-time PCR methods for detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7, and introduction of a general internal amplification control. **Journal of Microbiological Methods**. v. 59, p. 337 - 349. 2004.

KÖPPEL, R., DVORAK, V., ZIMMERLI, F., BREITENMOSER, A., EUGSTER, A., WAIBLINGER, H. U. Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food. **European Food Research and Technology**, 230, p. 367-374, 2010.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK J.; LIND, K.; SINDELKA R.; SJÖBACK R.; SJÖGREEN B.; STRÖMBOM L.; STÅHLBERG A.; ZORIC, N. The Real Time Polymerase Chain Reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford NY, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.

KUNTZ, T. B.; KUNTZ, S. T. Enterohemorrhagic E. coli infection. **Primary Care Update Ob/Gyns**, v. 6, n. 6, p. 192-196, 1999.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 57, n. 5, p. 702-709, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v57n5/26920.pdf>>. Acesso em: 03 Jun. 2011.

LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

LEITE JR, A. F. S.; TORRANO, A. D. M.; GELLI, D. S. 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.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIR, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetic and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LEVIN, R. E. The application of real-time PCR to food and Agricultural systems. A review. **Food Biotechnology**, v. 18, p. 97-133, 2004.

LIEWEN, M. B.; PLANTZ, M. W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Nebraska. **Journal of Food Protection**, v. 51, p. 840-841, 1988.

LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; MANTELL, C.; BERCROFT, D.; DOVE, B.; FARMER, K.; TONKIN, S.; YEASTS, N.; STAMP, R.; MICKLESON, K. Epidemic perinatal listeriosis. **Pediatric Infectious Diseases**, v. 3, p. 30-34, 1984.

LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; DONG LOU, X.; GOULET, V.; MAY, S.; SALINEM, C.; HIRD, D. W.; YONEKURA, M. L.; HAYES, P.; WEAVER, R.; AUDURIER, A.; PLIKAYTIS, B. D.; FANNIN, S. L.; KLEKS, A.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis

associated with Mexican-style cheese. **New England Journal of Medicine**, v. 319, p. 823-828, 1988.

LIOR, H. C. *E. coli* O157:H7 and verotoxigenic *E. coli*. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 13, n. 10, p. 592, 1993.

LISITA, M. O. **Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo minas frescal em uma indústria de laticínios**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, 2005. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>. Acesso em: 05 fev. 2006.

LOGAN, J.; EDWARDS, K.; SAUNDERS, N. **Real-time PCR: Current technology and applications** (1. ed.). Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009.

LOVETT, J.; FRANCIS, D. W.; HUNT, J. M. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 3, p. 188-192, 1987.

LOVETT, J. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 71, p. 658-660, 1988.

LYYTIKÄINEN, O.; AUTIO, T.; RUTTU, P.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; MIETTINEN, M.; HATAKKA, M.; MIKKOLA, J.; ANTTILA, V. J.; JOHANSSON, T.; RENTALA, L.; AWLTO, T.; KORKEALA, H.; SIITONEN, A. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 1838-1841, 2000.

MACEDO, R. E. F.; PFLANZER JÚNIOR, S. B. Evaluation of the microbiological quality of type C pasteurized milk marketed in the metropolitan region of Curitiba, PR. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 128, p. 103-108, 2005.

MACHADO, L. M. P. **Uso de soro de queijo e amido de milho modificado na qualidade do doce de leite pastoso**. 2005. 170 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2005.

MACKEY, B. M.; BRATCHELL, N. The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 9, p. 89-94, 1989.

MADRONA, G. S.; ZOTARELLI, R. B.; BRANCO, I. G. Estudo do efeito da adição de soro de queijo na qualidade sensorial do doce de leite pastoso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 826-833, out-dez. 2009.

MAFRA, I., FERREIRA, I., BEATRIZ, M., OLIVEIRA, P. P. (2008). Food authentication by PCR-based methods. **European Food Research and Technology**, 227, 649-665.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RADSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 39-48. 2003.

MARQUES, C. S. **Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos**. 2005. 64 f. Dissertação

(Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MARTÍN, M.C.; MARTÍNEZ, N.; DEL RIO, B.; LADERO, V.; FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ, M.A. A novel real-time polymerase chain reaction-based method for the detection and quantification of lactose-fermenting Enterobacteriaceae in the dairy and other food industries. **Journal Dairy Science**, v. 93, p. 860-867, 2010.

MARTINEZ, E.; HOUGH, G.; CONTARINI. Sandiness prevention in dulce de leche by seeding with lactose. **Journal of Dairy Science**, Ohio, v. 73, n. 3, p. 612-616, 1990.

MARTINS, J.F.P.; LOPES, C.N. Doce de leite: aspectos da tecnologia de fabricação. **Instruções técnicas**. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, n.18, p. 1-37, 1981.

MASSA, S. ALTIERI, C.; QUARANTA, V.; DE PACE, R. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4°C. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 347-350, 1997.

McKILLIP, J. L.; JAYKUS, L. A.; DRAKE, M. A. A comparison of methods for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 from artificially-contaminated dairy products using PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 49-55, 2000.

McLAUHLIN, J.; HALL, S. M.; VELANI, S. K.; GILBERT, R. J. Human listeriosis and paté: a possible association. **British Medical Journal**, v. 303, p. 773-775, 1991.

McLAUHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food Control**, v. 7, p. 187-193, 1996.

MEAD, P. S.; GRIFFIN, P. M. *Escherichia coli* O157:H7. **The Lancet**, v. 352, p. 1207 - 1212, 1998.

MECHIE, S. C.; CHAPMAN, P. A.; SIDDONS, C. A. A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. **Epidemiology and Infection**, v. 188, p. 17-25, 1997.

MELO, A. C. M.; ALVES, L. M. C.; COSTA, F. N. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo tipo Minas Padrão comercializado na cidade de São Luis, MA. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.4, p.547-551, out./dez., 2009.

MENG, J.; DOYLE, M. P.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S. A multiplex PCR for identifying Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 172-176, 1997.

MICHELIN, A. F. Surto de intoxicação alimentar estafilocócica no município de Birigüi, São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 1, p. 46-49, 2006.

MINISTÉRIO DO COMÉRCIO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR (MDIC). **Exportação - regiões exportadoras e setores**. Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/sistemas_web/aprendex/cooperativismo/index/conteudo/id/308>. Acesso em: 05 jan. 2012.

MORAES, C. R. **Qualidade bacteriológica de leite bovino de mistura, in natura e beneficiado, e detecção sorológica de brucelose em rebanhos da região metropolitana de**

Porto Alegre-RS, 2005, 86p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Rural do Rio Grande do Sul (URRS), Porto Alegre-RS, 2005.

MORGAN, G. M.; NEWMAN, C. P.; HUTCHINSON, D. N.; WALKER, A. M.; ROWE, B.; MAJID, F. Verotoxin producing *Escherichia coli* infections associated with the consumption of yogurt. **Epidemiology and Infection**, v. 111, p. 181-187, 1993.

MOREIRA, C. N.; PEREIRA, M. A.; BROD, C. S.; RODRIGUES, D. P.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 93, p. 179-183, 2003.

MORTARINO, M. FRANCESCHI, A.; MANCIANTI, F.; BAZZOCCHI, C.; GENCHI, C.; BANDI, C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. **Parassitologia**, Roma, v. 46, n. 1-2, p.163-167, 2004.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed reaction. **Methods in enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific american**, New York, v. 262, p. 56-65, 1990.

MURIAMA, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 54-63, 1996.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Medical microbiology**. 3. ed. Mosby-Year Book, 1998, p. 175-188.

NASCIMENTO, M. S.; BERCHIERI Jr, A.; BARBOSA, M. D.; ZANCAN, F. T.; ALMEIDA, W. A. F. Comparação de meios de enriquecimento e de plaqueamento utilizados na pesquisa de *Salmonella* em carcaças de frango e fezes de aves. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 1, p. 85 - 91, 2000.

NERO, L. A. *Listeria monocytogenes e Salmonella spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção*. 2005. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo (SP), 2005. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>. Acesso em: 12 fev. 2006.

NICHOLS, G.; GREENWOOD, M.; LOUVOIS, J. The microbiological quality of soft cheese. **PHLS Microbiology Digest**, v. 13, n. 2, p. 68-75, 1997.

NYGREN, J.; SVANVIK, N.; KUBISTA, M. The interaction between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. **Biopolymers**, New York, v. 46, p. 39-51, 1998.

OKREND, A. J. G.; ROSE, B. E.; BENNETT, B. A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 3, p. 249-252, 1990.

OKSÜZ, O.; ARICI, M.; KURULTAY, S.; GÜMUS, T. Incidence of *Escherichia coli* O157 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 6, p. 453-456, 2004.

- OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Foodborne Pathogens and Disease, v. 2, n. 2, p. 115-129, 2005.
- OLSEN, S. J. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium infection from milk contaminated after pasteurization. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 932-935, 2004.
- OMORI, G.; KATO, Y. A staphylococcal food-poisoning caused by a coagulase negative strain. **Bilken Journal**, Suita, v. 2, p. 92, 1959.
- OMICCIOLI, E.; AMAGLIANI, G.; BRANDI, G.; MAGNANI, M. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. **Food Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 615-622, set. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002009001026>>. Acesso em: 15 jan. 2012.
- ORAVCOVÁ, K. Detection and quantification of *Listeria monocytogenes* by 5' -nuclease polymerase chain reaction targeting the *actA* gene. **Letters in Applied Microbiology**, n. 42, p. 15-18, 2006.
- ORDEN, J. A.; CID, D.; BLANCO, M. E. Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-one production by staphylococci isolated from mastitis in sheep. **Acta pathologica microbiologica et immunologica scandinavica**, v. 100, p. 132-134, 1992.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE NO BRASIL (OPAS). **Boas Práticas de Fabricação e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle**. 2001. Disponível em: <http://bvs.panalimentos.org/local/File/Guias_para_gerenciamento_riscos_sanitarios_em_alimentos.pdf>. Acesso em: 06 jan. 2012.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO (FAO). Projetos em Segurança Alimentar/Redução da Pobreza e Desenvolvimento Rural. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/listaproj.asp>>. Acesso em: 06 jan. 2011.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Food safety**. Report by the Director-General. Washington: WHO/OMS, 1999. 9p.
- ÖZTURKOGTU, S.; GÜRAKAN, C.; ALPAS, H. Behaviour and control of *Listeria innocua* during manufacture and storage of Turkish white cheese. **European Food Research and Technology**, v. 222, p. 614-621, 2006.
- PAULETTI, M., CALVO, C., IZQUIERDO, L., COSTELL, E. Color and texture of dulce de leche, a confectionary dairy product – Selection of instrumental methods for industrial quality control. **Revista Española de Ciência y Tecnología de Alimentos**, v. 32, n. 3, 291-305, 1992.
- PAVLOVIC, S., SANTOS, R. C., SILVA, M. E., GLORIA, M. B. A. Effect of processing on the nutritive value of doce de leite, a typical Latin–American confectionary product. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, n. 4, p. 691-698, 1992.

- PEREIRA, J.L.; SALZBERG, S.P.; BERGDOLL, M.S. Production of staphylococcal enterotoxin D in foods by low-enterotoxin-production staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 14, n.1, p.19-26, 1991.
- PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M.C.A.; BASTOS, E.M.A.F.; CAIAFFA, W.T.; FALEIRO, E.S.C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 5, 1999.
- PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas, em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 21, n. 2, 2001.
- PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C. Queijo Minas tipo Frescal Artesanal e Industrial: qualidade macroscópica, microscópica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 83, p. 63, 2001.
- PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; TEIXEIRA, I. S. C.; LIMA, S. I.; CARNICEL, F. A.; HOFFMANN, F. L. Surtos de doenças transmitidas por alimentos contaminados por *Staphylococcus aureus*, ocorridos no período de dezembro de 2001 a abril de 2003, na região de São José do Rio Preto - SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 2, p. 232-237, 2004.
- PERRONE, I. T.; STEPHANI, R.; NEVES, B. S. **Doce de leite: Aspectos tecnológicos**. Juiz de Fora. Do Autor, 2011. 186p.
- PERRONE, I. T.; RENHE, I. R. T.; LIMA, B. R. Tecnologias para fabricação de Leite Condensado. In: PERRONE, I.T.; RENHE, I. R. T.; SILVA, P. H. F. S., (Org). **Leite condensado: Identidade, qualidade e tecnologia**. Juiz de Fora: Templo, 2011. p. 81-92.
- PIKNOVÁ L.; KACLIKOVÁ, E.; PANGALLO, D.; POLEK, B. KUCHTA, T. Quantification of *Salmonella* by 5' -nuclease real-time polymerase chain reaction targeted to *fimC* gene. **Current Microbiology**, n. 50, p. 38-42, 2005.
- PITT, W. M.; HARDEN, T. J.; HULL, R. R. *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 1, p. 49-65, abr. 1999.
- PRADO, E. H. R. B.; TRISTAO, L. ; GOMES, M. ; CERQUEIRA, A. M. F. ; GUTH, B. E. C.; ANDRADE, J. R. C. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) gene sequences in health cattle from Rio Grande do Sul state, Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 21., 2001, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001. p. 96. Resumo.
- PRODUCE SAFETY PROJECT. Health-related costs from foodborne illness in the United States. Disponível em: <<http://www.producesafetyproject.org>>. Acesso em: 20 jan. 2011.
- RAPINI, L. S.; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, 2004.
- RAPINI, L.S.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; VERAS, J. F.; SOUZA, M. R. Presença de *Staphylococcus* spp produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do

choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, 2005.

REA, S. CHIKUNI, K.; BRANCIARI, R.; SANGAMAYYA, R. S.; RANUCCI, D.; AVELLINI, P. Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. **Journal of Dairy Research**, London, v. 68, p. 689-698, 2001.

REIS, R. B.; MAMIZUKA, E. M.; FRANCO, B. D. G. M. Produção de imunorreagentes para uso em um teste imunoenzimático de detecção de *Salmonella* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 261-226, set-dez. 2001.

REIS, R. B.; MAMIZUKA, E. M.; FRANCO, B.D.G.M. Padronização de um teste imunoenzimático para detecção de *Salmonella* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 105-110, mai-ago. 2002.

RIJPENS, N.; HERMAN, L. Comparison of selective and nonselective primary enrichments for the detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 15-22, 2004.

ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology: the microbiology of milk**. London and New Jersey: Applied Science Publishers, 1981. 258p.

ROCOURT, J; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p. 337-352.

RODRIGUES, D. A.; FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.

Evaluation of the efficiency of threes selective agars for *L. monocytogenes* isolation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, suppl., 2003.

RODRIGUES, K. L.; MOREIRA, A. N.; ALMEIDA, A. T. S.; CHIOCHETTA, D.; RODRIGUES, M. J.; BROD, C. S.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, 2004.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., LOMBARD, B., SMITH, H., RZEUZUTKA, A., D'AGOSTINO, M., HELMUTH, R., SCHROETER, A.; MALORNY, B.; MIKO, A.; GUERRA, B., DAVISON, J.; KOBILINSKY, A.; HERNÁNDEZ, M.; BERTHEAU, Y.; COOK, N. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Food Science and Technology**, 18, p. 306 - 319, 2007.

ROSENOW, F. M.; MARTH, F. H. *Listeria*, listeriosis and dairy foods: a review. **Cult Dairy Prod J**, p. 13-17, 1987.

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 169-183, 1991.

SÁ, J. F. O., PERRONE, I. T., SILVA, P.H.F., FARIA, L. M. G. C.; COLOMBO, M. Perfil do leite condensado produzido no Brasil. **Revista do Instituto Cândido Tostes**. 2008. v. 63, p. 42-45.

SABIONE, J.G.; SILVA, D. O.; PINHEIRO, A. J. R.; BORGES, A. C.; CHAVES, J. B. P. Control of lactose crystallization in “Dulce de leche” by *Kluyveromyces lactis* fermentation. **Journal of dairy science**. Ohio, v. 67, n. 8, p. 1694-1698, 1984.

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

SANDBERG, M., LUNDBERG, L., FERM, M., YMAN, I. M. Real time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. **European Food Research and Technology**, 217, p. 344 - 349, 2003.

SANDERSON, M. W.; GAY, J. M.; HANCOCK, D. D. Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 2616-2619, 1995.

SANGALETTI, N. **Estudo da vida útil do queijo Minas Frescal disponível no mercado**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz. ESALQ/USP, Piracicaba, SP. 2007.

SANT'ANA, A. S.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre o sistema Petrifilm RSA® e a metodologia convencional para a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, 2005.

SANTANA, E H. W.; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; MORAES, L. B.; TAMANINI, R.; SILVA, W. P. Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. **Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 639-646, 2006.

SANTOS, D. M. Arenosidade no doce leite. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v. 31, n. 185, p. 3-9, mai/jun. 1976.

SANTOS, W. L. M. Avaliação microbiológica de saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes industriais da cidade de Belo Horizonte. **Revista Higiene Alimentar**, v. 11, n. 40, p. 26-30, 1997.

SANTOS, P. L. S. **Perfil sócio-econômico de produtores e aspectos produtivos e sanitários de rebanhos leiteiros da Paraíba**. 2008. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária de Ruminantes e Equídeos), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos-PB, 2008.

SCHLECH, W. F.; LAVIGNE, P. M.; BORTOLUSSI, R. A.; ALLEN, A. C.; HALDANE, E. V.; WORT, A. J.; HIGHTOWER, A. W.; JOHNSON, S. E.; KING, S. H.; NICHOLLS, E. S.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. **New England Journal of Medicine**, v. 308, p. 203-206, 1983.

SCHNEIDER, S.; ENKERLI, J.; WIDMER, F. A generally applicable assay for the quantification of inhibitory effects on PCR. **Journal of Microbiological Methods**, 78, 351-353, 2009.

SHARP, M. E. Microbiology of cheese. **Dairy Microbiology**, v.2, p.1-157, 1981.

SHORTLE, D. A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. **Gene**, n. 22, p. 181-182, 1983.

SILVA, G. A. V. **Avaliação das condições de obtenção do leite e da ação de sanificantes no tanque de expansão em uma propriedade leiteira no município de Candeias/BA**. Salvador – BA: estudo de caso. 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde da Escola de Nutrição) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 241-248, 2003.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação**. São Paulo: Livraria Varela, 2005. 623 p.

SILVA, M. C. C.; CASTRO, C. C. G. Ocorrência de surto de toxinfecção alimentar causada por queijo tipo minas In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 8., 1995, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes, p. 145-147, 1995.

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

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

SILVA, P. H. F.; SÁ, J. F. O.; PERRONE, I.T. Tecnologias para fabricação de Leite Condensado. In: PERRONE, I.T.; RENHE, I. R. T.; SILVA, P. H. F. S., (Org). **Leite condensado: Identidade, qualidade e tecnologia**. Juiz de Fora: Templo, 2011. p. 191-192.

SILVA, T. J. P.; PINHEIRO, A. J. R.; CHAVES, J. B. P. Utilização de Beta-D-galactosidase no processo contínuo de fabricação de doce de leite homogeneizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 39, n. 232, p. 19-30, mar/abr. 1984.

SILVA, W. P.; CARRO-TCHERA, S.; MONKS-JANSEN, M.; EUCARES-VONLAER, A.; LIMA, A. S.; MAGALHÃESMATA, M. *Listeria monocytogenes* em queijos tipo minas produzidos artesanalmente e comercializados em Pelotas city, Brazil. **Alimentaria**, v. 41, n. 359, p. 57-60, 2004.

SLADE, P. J.; COLLINS-THOMPSON, D. L. Incidence of *Listeria* species in Ontario raw milk. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, v. 21, p. 425-429, 1988.

SOUSA, C. L.; NEVES, E. C. A.; CAMEIRO, C. A. A.; FARIAS, J. B.; PEIXOTO, M. R. S. Avaliação microbiológica e físico-química de doce de leite e requeijão produzidos com leite de búfala na Ilha de Marajó - PA. **Boletim do CEPPA**, v. 20, n. 2, 191-202, 2002.

- SOUSA, C. L.; TORO, M. U.; NEVES, E. C. A. Avaliação microbiológica e físico-química do queijo *cottage* comercializado na cidade de Belém-PA. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 133, p. 86-91, 2005.
- SPREER, E. **Lactologia Industrial**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1991.
- SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 2, p. 195-202, 1997.
- SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology**, fundamentals and frontiers. 2. ed., Washington D. C.: ASM, 2001. cap. 18, p. 383-409.
- TANABE, S., HASE, M., YANO, T., SATO, M., FUJIMURA, T., AKIYAMA, H. A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 3131-3135, (2007).
- TANN, R. Manufacture of sweetened condensed milk and significance of lactose therein in FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry: lactose, water, salts and minor constituents**. 4ed. London: Thomson Science, vol. 3, 789p. 2009.
- TAPPERO, J. W.; SCHUCHAT, A.; DEEVER, K. A.; MASCOLA, L.; WENGER, J. D. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? The listeriosis Study Group. **Journal of the American Medical Association**, v. 273, p. 1118-1122, 1995.
- TERÁN-ORTIZ, G. P. **Efeito de adição de gomas xantana e locusta na cinética de inibição de cristalização de açúcares em doce de leite**. 1998. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.
- TIMM, C. D.; GONZALEZ, H. L.; BERMUDEZ, R. F.; OLIVEIRA, D.S.; B6UCHLE, J. ALEXIS, M.A.; COELHO, F. J. O.; PORTO, C. R. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado integral, produzido em micro-usinas da região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 106, p. 100-104, 2003.
- TIMM, C. D., CONCEIÇÃO, R. C. S., COELHO, F. J. O., ROOS, T. B., TEJADA, T. S., QUEVEDO, P. S. Avaliação microbiológica de doce de leite pastoso. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 3, 275-277, 2007.
- TINOCO, A. L. A.; COELHO, M. S. L.; PINTO, P. S. A.; NOVATO, M. R. R. BEZ, F.; BARCELLOS, R. M. C. A comparative microbiological study of pasteurised milk at establishments subjected to federal inspection and at farms. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 96, p. 88-93, 2002.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2003. p. 308.
- TRABULSI, L. R.; ALTETHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. 587 p.

UPTON, P.; COIA, J. E. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurized milk supply. **The Lancet**, v. 344, p. 1015, 1994.

VARGAS, M. M et al. Influência da gordura, da glucose e do amido na cristalização do doce de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v.37, n.221, p. 25-30, mai/jun. 1982.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología**. Zaragoza (España): Acribia, 1995.

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

VERAS, J. F.; CARMO, L. S.; TONG, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; SANTOS, D. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CANTINI, A.; NICOLI, J. R.; MARTI, J. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, 2008. (IN PRESS).

VILLAR, R. G.; MACEK, M. D.; SIMONS, S.; HAYES, P. S.; GOLDOFT, M. J.; LEWIS, J. H.; ROWAN, L. L.; HURSH, D.; PATNODE, M.; MEAD, P. Investigation of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT 104 infections linked to raw-milk cheese in Washington State USA. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 281, n. 19, p. 1811-1816, 1999.

WALDNER, D. N.; STOKES, S. R.; JORDAN, E. R.; LOOPER, M.L. **Managing milk composition: normal sources of variation**. Online. Disponível em: <<http://www.osuextra.com>>. Acesso em 12 set. 2005.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; BOEKEL, M. A. J. S. **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos**. 1. ed., Zaragoza: Acribia, p. 439-441, 2001.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEUTERS, T. J. **Dairy Science and Technology**, 2. ed., Boca Raton, Florida: EUA, 2006, 781p.

WANG, G.; ZHAO, T.; DOYLE, M. P. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized and pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 6, p. 610-613, 1997.

WANG, L.; LI, Y.; MUSTAPHA, A. Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation. **Journal of Food Protection**, n. 70, p. 1366-1372, 2007.

WEDDESKOPP, A.; STROGER, U.; LIND, P. *Salmonella dublin* in Danish Dairy Herds: frequency of change to positive serological status in bulk tank milk ELISA in relation to serostatus of neighbouring farms. **Acta Veterinaria Scandinavia**, n. 42, p. 295-302, 2001.

WEISS D.; HILGER M.; MEYER H. H. D. BRUCKMAIER R. M. Variable milking intervals and milk composition. **Milchwissenschaft**, v. 57, n. 5, p. 246-249, 2002.

WHITTIER, E. O. Lactose and its utilization: a review. **Journal of Dairy Science**. Ohio, v. 27, n. 7, p. 505-529, Jul. 1944.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. **The Lancet**, London, v. 4, p. 337-348, 2004.

ANEXO

Tabela NMP. Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos em série de três tubos. Quantidade inoculada da amostra: 0,1 - 0,01 e 0,001g ou mL

(continua)

Combinação de tubos +	NMP/g ou mL	Intervalo de confiança (95%)		Combinação de tubos +	NMP/g ou mL	Intervalo de confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo			Mínimo	Máximo
0-0-0	<3,0	-	9,5	2-2-0	21	4,5	42
0-0-1	3,0	0,15	9,6	2-2-1	28	8,7	94
0-1-0	3,0	0,15	11	2-2-2	35	8,7	94
0-1-1	6,1	1,2	18	2-3-0	29	8,7	94
0-2-0	6,2	1,2	18	2-3-1	36	8,7	94
0-3-0	9,4	3,6	38	3-0-0	23	4,6	94
1-0-0	3,6	0,17	18	3-0-1	38	8,7	110
1-0-1	7,2	1,3	18	3-0-2	64	17	180
1-0-2	11	3,6	38	3-1-0	43	9	180
1-1-0	7,4	1,3	20	3-1-1	75	17	200
1-1-1	11	3,6	38	3-1-2	120	37	420
1-2-0	11	3,6	42	3-1-3	160	40	420
1-2-1	15	4,5	42	3-2-0	93	18	420
1-3-0	16	4,5	42	3-2-1	150	37	420
2-0-0	9,2	1,4	38	3-2-2	210	40	430
2-0-1	14	3,6	42	3-2-3	290	90	1.000
2-0-2	20	4,5	42	3-3-0	240	42	2.000
2-1-0	15	3,7	42	3-3-1	460	90	4.100
2-1-1	20	4,5	42	3-3-2	1.100	180	4.100
2-1-2	27	8,7	94	3-3-3	>1.100	420	-

Fonte: *Bacteriological Analytical Manual* (Blodgett, 2006).