



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DE RISCOS E DE PONTOS CRÍTICOS DE
CONTAMINAÇÃO POR *Enterococcus* spp.
E *Bacillus cereus* NO PROCESSAMENTO DE RICOTA**

MEG DA SILVA FERNANDES

Química de Alimentos

ARNALDO YOSHITERU KUAYE

Orientador

**Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em
Tecnologia de Alimentos**

Campinas – SP
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Fernandes, Meg da Silva.

Avaliação de riscos e de pontos críticos de contaminação por
Enterococcus spp. e *Bacillus cereus* no processamento de ricota / Meg
da Silva Fernandes. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ricota. 2. *Bacillus cereus*. 3. *Enterococcus*. 4.
Enterococcus faecium. 5. *Enterococcus faecalis*. I. Kuaye, Arnaldo
Yoshiteru. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III.Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Risks and critical points assessment of contamination by *Enterococcus* spp. and
Bacillus cereus in the processing of ricotta.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Ricotta, *Bacillus cereus*, *Enterococcus*, *Enterococcus*
faecium, *Enterococcus faecalis*

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Ernani Porto

Maristela da Silva do Nascimento

Data de defesa: 15/07/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
(Orientador)**

**Prof. Dr. Ernani Porto
(Membro)**

**Dr^a. Maristela da Silva do Nascimento
(Membro)**

**Prof. Dr. Marcelo Cristianini
(Membro)**

**Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Membro)**

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos".

Fernando Pessoa

*Às pessoas mais importantes da minha vida:
Minha amada mãe, Gilza, meu irmão Darci, meus
queridos avós Maria, Ivanir e Airton e tia Fátima.
Sem o apoio de vocês, jamais teria saído do Rio
Grande do Sul para alçar vôos mais altos, ainda que
fosse muito doloroso estarmos distantes.
Tudo o que sou é fruto de seus imensos esforços para
oferecerem o melhor para mim.
Sem vocês, eu não seria nada do que sou.
Muito obrigada por tudo! Amo muito vocês!!!
Dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela presença constante em minha vida.

Ao prof. Dr. Arnaldo por ter me aceitado como sua orientada, pelo incentivo e sugestões sempre tão oportunas. Aprendi muito com o senhor! Obrigada por tudo!

À minha querida família, presente em todos os momentos, ainda que 1000Km nos separassem. Um agradecimento especial às pessoas que me apoiaram e incentivaram sempre: tia Zilda, Duda e família, tio Zeca e tio Rogério e família. Eu os amo muito e serei eternamente grata.

À minha grande amiga Rita, por todo apoio, incentivo, ombro amigo, ouvido paciente, palavras sábias. Amiga para todas as horas, nas melhores horas... “Dos amores humanos, o menos egoísta, o mais puro e desinteressado é o amor da amizade”. Ritinha amo você! Obrigada por tudo!!!

Ao Chico, por todo apoio, incentivo e companheirismo que foram indispensáveis para que eu chegasse até o final desta jornada. Por toda ajuda e dedicação que me ofereceu na elaboração deste trabalho. Por tudo, serei eternamente grata a você, meu amor!

A querida amiga Graci, pela grande ajuda nas coletas, nas análises e os ensinamentos sobre a microbiologia, o meu MUITO OBRIGADA! Sem você talvez eu não tivesse conseguido realizar este trabalho...

À amiga Leandra, muito especial para mim. Obrigada por toda força, apoio, incentivo e bons momentos compartilhados durante estes dois anos de mestrado.

Ao querido amigo Márcio, um dos grandes incentivadores para que eu chegasse até aqui. Obrigada pela imensa ajuda que me deu quando vim prestar a prova de seleção para o mestrado e mais uma vez obrigada por ter me acolhido quando cheguei a Campinas. Você é uma pessoa rara!

À Dirce pelas valiosas dicas de microbiologia, por todos os ensinamentos que fizeram eu me apaixonar pela microbiologia e pela ajuda nas correções da

minha dissertação. Agradeço em especial, os momentos felizes que compartilhamos.

Aos amigos do laboratório de Higiene de Alimentos Marisa, Marcília (pela ajuda nas coletas e análises), Luciana, Maria Amélia, Isa, Bia, Iza, André, Celina, Juliana, Raquel, Vanessa pelas dicas, ajuda nas análises e principalmente pelos alegres momentos de descontração e pela convivência.

À D. Denir pela ajuda e principalmente pelo carinho com que me tratou durante estes dois anos.

Aos funcionários da indústria de laticínios, em especial à Raquel pela gentileza e ao proprietário por conceder as visitas e coletas.

Aos amigos, que mesmo distantes, estiveram sempre presente, me apoiando e oferecendo o ombro amigo, em especial à Denise, Cibele e Júnior.

Ao prof. Dr. Daniel Barrera Arellano, que ao longo destes dois anos se tornou um amigo, me incentivou a fazer o doutorado e através do PED me ensinou sobre a vida acadêmica. Não poderia deixar de agradecer pela ajuda que me ofereceu em um dos momentos que mais precisei. Prof. Daniel muito obrigada!

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões na conclusão deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

A todos os amigos que conquistei aqui em Campinas e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (laboratórios, secretaria e funcionários).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 Ricota.....	27
3.2 Queijo ricota e a saúde pública.....	29
3.3 Microrganismos previstos em queijos de muito alta umidade segundo a RDC 12/2001	31
3.3.1 Coliformes a 45°C	31
3.3.2 Estafilococos coagulase positiva e negativa	33
3.3.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	36
3.3.4 <i>Salmonella</i> spp.....	38
3.4 <i>Bacillus cereus</i> em queijos	40
3.4.1 Características da espécie <i>B. cereus</i>	40
3.4.2 Identificação de <i>B. cereus</i>	41
3.4.3 Patogenicidade de <i>B. cereus</i>	42
3.4.4 Surtos de intoxicação alimentar por <i>B. cereus</i>	44
3.5 <i>Enterococcus</i> spp. em queijos	47
3.5.1 Características do gênero <i>Enterococcus</i>	47
3.5.2 Fontes de <i>Enterococcus</i>	48
3.5.3 Patogenicidade de <i>Enterococcus</i> spp.	49
3.5.3.1 Resistência aos antimicrobianos	52
4 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 Características da indústria	55
4.2 Coleta das amostras.....	55
4.3 Preparo das amostras.....	61
4.4 Determinação de <i>Bacillus cereus</i>	61
4.5 Determinação de <i>Enterococcus</i> spp.	62
4.5.1 Identificação de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> através de Reação de Polimerização em Cadeia – PCR.....	63
4.5.2 Avaliação do potencial de patogenicidade das culturas de <i>Enterococcus</i> spp.	64
4.5.2.1 Atividade de hemolisinas.....	64
4.5.2.2 Produção de gelatinase.....	65
4.5.2.3 Atividade de termonucleases	65
4.5.3 Avaliação da resistência de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> aos antibióticos... 65	
4.6 Avaliação microbiológica da ricota conforme a RDC ANVISA nº 12/2001... 66	
4.6.1 Determinação de coliformes a 45°C.....	66
4.6.2 Determinação de estafilococos coagulase positiva	67
4.6.3 Detecção de <i>Salmonella</i> spp.....	67
4.6.4 Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	68
4.7 Análise de potabilidade da água.....	68

4.7.1	Determinação de coliformes a 45°C.....	69
4.7.2	Contagem total de aeróbios mesófilos	69
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	70
5.1	Avaliação de <i>Bacillus cereus</i> no processamento de ricota	70
5.1.1	Matéria-Prima.....	70
5.1.2	Amostras ambientais.....	72
5.1.3	Produto final	75
5.2	Avaliação de <i>Enterococcus</i> spp. no processamento de ricota.....	79
5.2.1	Matéria-Prima.....	79
5.2.2	Amostras de instalações, equipamentos e utensílios.....	80
5.2.3	Produto final	85
5.2.4	Identificação de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> através de Reação de Polimerização em Cadeia – PCR.....	88
5.2.5	Avaliação dos fatores de virulência.....	91
5.2.6	Resistência aos antimicrobianos.....	95
5.3	Avaliação da qualidade microbiológica de ricotas	102
5.3.1	Conformidade com os Padrões Legais	102
5.3.2	Coliformes a 45°C	103
5.3.3	Estafilococos coagulase positiva.....	104
5.3.4	<i>Salmonella</i>	105
5.3.5	<i>Listeria monocytogenes</i>	105
5.4	Avaliação microbiológica complementar.....	106
5.5	Avaliação da potabilidade de água	108
6	CONCLUSÕES.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características diferenciais das espécies de <i>Bacillus</i> spp. pertencentes ao Grupo 1A.....	42
Tabela 2. Surtos de intoxicação alimentar por <i>B. cereus</i> no Brasil.....	44
Tabela 3. Principais causas de surtos de intoxicação alimentar por <i>Bacillus cereus</i> nos Estados Unidos, 1993-1997.....	46
Tabela 4. Fatores de virulência de enterococos e seu modo de ação.....	51
Tabela 5. Prevalência dos fatores genotípicos de virulência entre <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> obtidos de amostras de queijos no Brasil.....	51
Tabela 6. Número de amostras coletadas na indústria de laticínios.....	56
Tabela 7. Descrição dos <i>primers</i> utilizados na identificação de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i>	64
Tabela 8. Padrão de interpretação dos diâmetros dos halos de identificação de inibição do crescimento de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i>	66
Tabela 9. Contagem de <i>Bacillus cereus</i> (UFC/ml) na matéria prima utilizada para a fabricação de ricota.....	70
Tabela 10. Contagem (UFC/cm ² ou unidade) de <i>B. cereus</i> em superfícies de ambientes, equipamentos e utensílios em indústria processadora de ricota.....	73
Tabela 11. Contagem de <i>B. cereus</i> (UFC/g) na ricota antes de embalada após 2h de enformagem.....	76
Tabela 12. Contagem de <i>B. cereus</i> (UFC/g) em amostras de ricota.....	76
Tabela 13. Contagem de <i>Enterococcus</i> spp. (UFC/ml) na matéria prima utilizada para a fabricação de ricota.....	79
Tabela 14. Contagem (UFC/cm ² ou unidade) de <i>Enterococcus</i> spp. em superfícies das instalações, equipamentos e utensílios em indústria processadora de ricota.....	81
Tabela 15. Contagem de <i>Enterococcus</i> spp. (UFC/g) na ricota antes de embalada.....	86

Tabela 16. Contagem de <i>Enterococcus</i> spp. (UFC/g) em ricotas.....	86
Tabela 17. Confirmação bioquímica do número de isolados do gênero <i>Enterococcus</i> e identificação das espécies de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> através da PCR.....	88
Tabela 18. Origem das cepas de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> isoladas na linha de processamento de ricota.....	89
Tabela 19. Total do número de cepas de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> provenientes de matéria-prima, produto final e amostras ambientes.....	89
Tabela 20. Avaliação fenotípica de fatores de virulência de isolados de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> de amostras de ricota depois de embaladas.....	92
Tabela 21. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos segundo o método de disco-difusão em ágar de isolados de <i>E. faecalis</i> obtidos de amostras de leite cru e ricota.....	95
Tabela 22. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos segundo o método de disco-difusão em Ágar de isolados de <i>E. faecium</i> obtidos de amostras matéria-prima e ricota.....	97
Tabela 23. Relação entre os testes fenotípicos de patogenicidade e resistência aos antimicrobianos de isolados de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> de amostras de ricota depois de embalada.....	101
Tabela 24. Padrões microbiológicos para queijos de muita alta umidade segundo a Resolução RDC ANVISA nº12/2001.....	102
Tabela 25. Avaliação microbiológica de ricotas de acordo com os parâmetros da Resolução RDC ANVISA nº 12/2001.....	103
Tabela 26. Contagem de estafilococos coagulase negativa em amostras de ricota.....	107
Tabela 27. Avaliação microbiológica da água utilizada na fabricação da ricota.....	108

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Números comparativos de surtos e casos causados por *Bacillus cereus* nos Estados Unidos entre o período de 1993-1997.....45
- Figura 2.** Fluxograma de produção da ricota e pontos de amostragem ambiental.....60
- Figura 3.** Caixa utilizada para o recolhimento do soro.....82
- Figura 4.** Tanque 2 – tubulação de saída do soro.....83
- Figura 5.** Formas contendo a ricota em contato com a parede analisada para a determinação de *Enterococcus* spp.....84
- Figura 6.** Foto ilustrativa do gel de agarose contendo produto de PCR do gene de identificação de espécies. Canaleta 1: Marcador molecular (100pb); 2 a 18: *E. faecium* isolados de amostras de ricota; 19: controle negativo; 20: controle positivo de *E. faecium* ATCC 6562 (550 pb).....90
- Figura 7.** Foto ilustrativa de gel de agarose contendo produto de PCR do gene de identificação de espécies. Canaleta 1: Marcador molecular (100pb); 2 a 9: controle positivo de *E. faecalis* ATCC 29212 (941 pb). Canaleta 10: Controle negativo.....90
- Figura 8.** Perfil de resistência (%) de *E. faecalis* a antibióticos de uso clínico isolados a partir de amostras de leite cru (a) e ricota (b).....96
- Figura 9.** Perfil de resistência (%) de *E. faecium* a antibióticos de uso clínico isolados a partir de amostras de leite cru (a), soro de queijo (b), ricota antes de embalada (c) e ricota depois de embalada (d).....99

APÊNDICE A:

Figura 10. Máquina de lavagem dos recipientes.....	130
Figura 11. Tanque de recepção do leite.....	130
Figura 12. Trocador de calor a placas.....	111
Figura 13. Tanque de recepção do soro com a bomba de transferência de soro.....	132
Figura 14. Caixa de recolhimento do soro.....	133
Figura 15. Aquecimento do produto com vapor direto.....	134
Figura 16. Retirada da espuma com jatos de água.....	135
Figura 17. Enformagem da ricota.....	136
Figura 18. Layout da indústria processadora de ricota.....	139
Tabela 28. Temperaturas alcançadas nos diferentes processamentos de queijos.....	131
Tabela 29. Relação dos produtos de higienização utilizados na indústria de laticínios.....	137

APÊNDICE B

Tabela B1. Provas bioquímicas para a confirmação do gênero <i>Bacillus</i> e identificação da espécie de <i>Bacillus cereus</i> em amostras de matéria prima, amostras ambientais, ar ambiente e ricota referentes à 1ª coleta.....	141
Tabela B2. Provas bioquímicas para a confirmação do gênero <i>Bacillus</i> e identificação da espécie de <i>Bacillus cereus</i> em amostras de matéria prima, amostras ambientais e ricota referentes à 2ª coleta.....	143
Tabela B3. Provas bioquímicas para a confirmação do gênero <i>Bacillus</i> e identificação da espécie de <i>Bacillus cereus</i> em amostras de matéria prima, amostras ambientais e ricota referentes à 3ª coleta.....	144

APÊNDICE C

Tabela C1. Provas bioquímicas para confirmação do gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR das amostras de matéria prima, amostras ambientais, ar ambiente e ricota referentes à 1ª coleta.....145

Tabela C2. Provas bioquímicas para confirmação do gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR das amostras de matéria prima, amostras ambientais, ar ambiente e ricota referentes à 2ª coleta.....147

Tabela C3. Testes presuntivos para confirmação do gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR das amostras de matéria prima, amostras ambientais, ar ambiente e ricota referentes à 3ª coleta.....149

APÊNDICE D

Tabela D1. Análises fenotípicas de fatores de virulência de *E. faecium* e *E. faecalis* isolados de ricota depois de embalada.....151

RESUMO

A ricota é um tipo de queijo fresco de origem italiana, obtido pela precipitação das proteínas do soro do queijo por acidificação associada ao calor. Por suas características nutricionais, físico-químicas e bioquímicas apresenta-se propícia ao desenvolvimento microbiano. No processamento deste produto destacam-se o *Bacillus cereus*, pela sua capacidade de esporular e ser um contaminante potencial do leite e do ambiente e as bactérias do gênero *Enterococcus*, pela característica ubíqua, habilidade de sobrevivência às condições diversas de pH, temperatura e salinidade e ocorrência em casos de infecções hospitalares. Os objetivos deste trabalho foram: a) verificar as possíveis fontes de contaminação de ricota por *B. cereus* e *Enterococcus* spp. ao longo do processamento; b) identificar as espécies de enterococos, avaliar o potencial de patogenicidade e o perfil de resistência destas espécies a antibióticos de uso clínico; e, c) avaliar a conformidade das amostras de ricota aos padrões microbiológicos legais. Amostras de leite cru e pasteurizado, soro de queijo, ricotas antes e após embalagem, superfícies diversas do ambiente e do ar obtidas em três coletas de laticínio da região Sul de Minas Gerais foram submetidas à determinação de *B. cereus* e *Enterococcus* spp. As contagens de *B. cereus* em leite cru, pasteurizado e soro de queijo, foram de $1,4 \times 10^4$, $1,2 \times 10^3$ e $1,0 \times 10^3$ UFC/ml, respectivamente, e, apenas uma amostra de ricota final apresentou valor maior que 10^2 UFC/g. Dentre as 60 amostras ambientais, destaca-se a forma de moldagem da ricota, que apresentou contaminação persistente e contagem de até $1,7 \times 10^7$ UFC/unidade de *B. cereus*. *Enterococcus* spp. foram encontradas em todas as amostras de ricota, com contagens entre 10^3 e 10^7 UFC/g, e em todas de leite cru, com contagens de até $1,9 \times 10^6$ UFC/ml. Nas superfícies de forma e tela, vassoura, parede e ralo foram encontrados valores superiores a 10^5 UFC/unidade; já para tanques, bancada da área de embalagem e caixa de recolhimento do soro os números foram superiores a 10^2 UFC/unidade. De um total de 136 isolados, confirmados para o gênero *Enterococcus*, 71,3% (97/136) foram confirmados para a espécie *E. faecium* e 20,6% (28/136) para *E. faecalis*, pela técnica de PCR. Os isolados (66) de *E. faecium* e *E. faecalis* das amostras de produto final submetidas aos testes fenotípicos resultaram em 89,4% (59/66) positivos para hemólise, nenhum para gelatinase (0/66) e 98,5% (65/66) positivos para termonuclease. A maioria dos isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* mostrou resistência a pelo menos três dos 5 antimicrobianos testados, destacando-se que 100% deles apresentaram resistência à vancomicina. De 15 amostras de ricota avaliadas após 21 dias de armazenamento sob refrigeração, 13,3% (2/15) estavam em desacordo com o padrão legal para estafilococos coagulase positiva e em nenhuma delas foi detectada a presença de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e coliformes termotolerantes. A natural e inevitável contaminação da matéria-prima e do ambiente de processamento de ricota por *B. cereus* e *Enterococcus* spp., bactérias estas potencialmente patogênicas, tem na eficiência dos programas de higienização um fator indispensável para o seu controle.

Palavras-chave: Ricota, *B. cereus*, *Enterococcus*, *E. faecium*, *E. faecalis*.

ABSTRACT

The ricotta is a type of fresh cheese of Italian origin, obtained by precipitation of proteins from cheese whey by acidification associated with the heat. Because of its nutritional, physicochemical and biochemical characteristics it is conducive to microbial growth. On the processing of this product it can be emphasized the *Bacillus cereus*, due to its ability to sporulate and be a potential contaminant of milk and the environment, and the bacteria of the genus *Enterococcus*, due its ubiquitous characteristic, ability to survive the various conditions of pH, temperature and salinity and appearance in cases of hospital infections. The objectives of the present work were: (a) to verify the possible sources of ricotta contamination by *B. cereus* and *Enterococcus* spp. during processing; (b) to identify the species of enterococci, evaluate the pathogenic potential and the resistance profile of these species to antibiotics of clinical use; and (c) to assess the conformity of samples of ricotta under legal microbiological standards. Samples of raw and pasteurized milk, cheese whey, ricotta before and after packaging, various surfaces of the environment and of air obtained from three collections on a dairy industry located in southern Minas Gerais were subjected to the determination of *B. cereus* and *Enterococcus* spp. The counts of *B. cereus* in raw and pasteurized milk and in cheese whey were $1,4 \times 10^4$, $1,2 \times 10^3$ and $1,0 \times 10^3$ CFU/ml, respectively, and only one sample of final ricotta had levels of *B. cereus* higher than $1,7 \times 10^7$ CFU/unity. Among the 60 environmental samples, it can be highlighted the mold where the ricotta is shaped, which showed persistent contamination and count up to $1,7 \times 10^7$ CFU/unity for *B. cereus*. All the samples of ricotta and raw milk showed the presence of *Enterococcus* spp. with counts between 10^3 and 10^7 CFU/g and up to $1,9 \times 10^6$ CFU/ml, respectively. On the surfaces of the mold, mesh, broom, wall and drain it were found counts higher than 10^5 CFU/unity; for the tank, stand in the area of packaging and box for the collection of serum the counts were higher than 10^2 CFU/unity. Over 136 isolated of the genus *Enterococcus*, 71,3% (97/136) were confirmed for the species *E. faecium* and 20,6% (28/136) for *E. faecalis* by PCR technique. The isolates (66) of *E. faecium* and *E. faecalis* taken from the samples of the final product submitted to phenotypic tests resulted in 89,4% (59/66) positive for hemolysis, none for gelatinase (0 / 66) and 98,5% (65/66) positive for thermonuclease. Most of the isolates of *E. faecium* and *E. faecalis* showed resistance to at least three of the 5 antimicrobials, highlighting that 100% of them were resistant to vancomycin. From 15 samples of ricotta evaluated after 21 days of refrigerated storage, 13,3% (2/15) were in disagreement with the legal standard for coagulase-positive staphylococci and none were detected the presence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and thermotolerant coliforms. The natural and inevitable contamination of raw-materials and of the processing environment of ricotta by *B. cereus* and *Enterococcus* spp., which are potentially pathogenic bacteria, have in the efficiency of the hygiene programs a essential factor for its control.

Key words: Ricotta, *B. cereus*, *Enterococcus*, *E. faecium*, *E. faecalis*.

1 INTRODUÇÃO

A ricota é um queijo fresco de origem italiana, obtido pela precipitação das proteínas do soro do queijo, por acidificação associada ao calor. A elaboração da ricota visa agregar valor ao soro, constituindo uma alternativa para o aproveitamento deste subproduto (EGITO et al., 2007).

A produção anual brasileira de ricota aumentou significativamente nos últimos anos. Em 1991, foi cerca de 4,1 t e no ano de 2003 praticamente dobrou, passando para 8,2 t (ABIQ, 2004). Um dos fatores por este aumento expressivo é a busca crescente por uma alimentação mais saudável e com baixo valor calórico.

Estima-se que todos os anos centenas de milhões de pessoas adoecem através do consumo de alimentos contaminados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997), sendo os produtos lácteos um dos principais envolvidos (DE BUYSER et al., 2001). Neste aspecto, a ricota possui características propícias à contaminação, sobrevivência e crescimento de microrganismos patogênicos, como: elevada atividade de água, grau de manipulação durante seu preparo e ausência do processo de maturação.

O controle de *Bacillus cereus* no processamento de produtos lácteos pode apresentar dificuldade devido à sua capacidade de esporulação e por ser um contaminante potencial do leite e do ambiente. A característica hidrofóbica dos esporos pode promover a formação de biofilmes nas superfícies de contato com alimentos, de difícil remoção pelos procedimentos de higienização (ANDERSSON; RONNER; GRANUM, 1995).

A pasteurização não é suficiente para eliminação deste patógeno cujos esporos são termorresistentes. Muitas cepas de *B. cereus* se apresentam com características psicrotróficas, sendo possível seu crescimento em temperaturas baixas como 4 a 6 °C, tais cepas também podem ser produtoras de enterotoxinas (DUFRENNE et al., 1994; DUFRENNE et al., 1995).

O *British Columbia Center for Disease Control* (2002) relatou a ocorrência de dois surtos de doenças transmitidas por alimentos no Canadá, envolvendo mais

de 100 pessoas devido à contaminação de leite por *Bacillus cereus*. Este patógeno foi identificado como agente etiológico de 45 (4,8%) dos 932 casos de doenças transmitidas por alimentos notificados à vigilância em 2002 (SÃO PAULO, 2002).

Os enterococos pertencem ao grupo das bactérias ácido-láticas e são amplamente distribuídas na natureza. O gênero compreende mais de 20 espécies, sendo que *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* são as espécies predominantes nos alimentos (GIRAFFA, 2003).

A recente ligação dos enterococos com o ser humano está relacionada à sua entrada na cadeia alimentar através da utilização como culturas *starter*, probióticos e produção de bacteriocinas, bem como seu habitat entérico, resistência a antimicrobianos tanto de uso clínico como veterinário, e seu envolvimento em infecções hospitalares.

A prevalência de enterococos em derivados do leite ocorre pelas condições não higiênicas durante o processo de coleta do leite ou ainda fontes de água, equipamentos utilizados para o processamento de queijos juntamente à sua resistência a temperaturas de pasteurização e sua habilidade de crescimento em diferentes substratos e condições adversas (RIBOLDI, 2007).

Entretanto, nas duas últimas décadas os enterococos surgiram como importantes patógenos oportunistas atingindo principalmente idosos, pessoas com doença grave, imunocomprometidas, hospitalizadas por longos períodos ou que fazem uso de terapia antimicrobiana de amplo espectro, além de serem considerados patógenos nosocomiais que causam endocardite, bacteremia e outras infecções (GELSOMINO et al., 2001; GIRAFFA, 2002). Nos Estados Unidos, os enterococos tornaram-se o segundo microrganismo comumente isolado do trato urinário e de feridas, e a terceira etiologia mais comum de bacteremia hospitalar (HÖRNER et al., 2005).

O aumento da severidade das infecções nosocomiais causadas por estas cepas multirresistentes a antimicrobianos e a falta de conhecimento sobre seus fatores de virulência geram insegurança na utilização das mesmas na produção de

alimentos, uma vez que a capacidade de transferência de informações genéticas pelo processo de conjugação pode ocorrer em nível de trato gastrintestinal em humanos (GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997; FRANZ; HOLZAPFEL; STILES, 1999; GIRAFFA, 2002; FRANZ et al., 2003; RIBOLDI, 2007).

Estudos recentes têm mostrado a presença de *Enterococcus* spp. em diferentes tipos de queijos, com predominância das espécies de *E. faecium* e *E. faecalis* (SUZZI et al., 2000; ÇITAK; YUCEL; ORHAN, 2004; SABIÁ et al., 2008; GOMES et al. 2008; ANDRADE, 2009). No entanto, até o momento não foi reportado na literatura um rastreamento deste microrganismo no processamento de ricota.

Diante do exposto, este estudo reveste-se de importância, pois através da avaliação de riscos e de pontos críticos de contaminação por microrganismos patogênicos no processamento de ricota consegue-se buscar medidas efetivas para o controle dos mesmos, especialmente àqueles que não são preconizados pela legislação vigente, como é o caso de *B. cereus* e *Enterococcus* spp.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral estudar a incidência de *Bacillus cereus* e *Enterococcus* spp. em indústria processadora de ricota situada na região Sul de Minas Gerais.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar as possíveis fontes de contaminação de ricota por *Bacillus cereus* e *Enterococcus* spp. durante o seu processamento;
- Isolar e identificar espécies de enterococos provenientes de amostras de matéria prima, amostras ambientais e de ricota;
- Avaliar o potencial de patogenicidade de *E. faecium* e *E. faecalis* através de testes fenotípicos;
- Determinar o perfil de resistência de *E. faecalis* e *E. faecium* aos antibióticos de uso clínico: eritromicina, gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina e vancomicina;
- Avaliar a adequação das amostras de ricota aos padrões microbiológicos da RDC ANVISA 12/2001.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ricota

O nome ricota é derivado da palavra em latim “*recocta*”, que significa re-cozido, ou cozido duas vezes. A ricota é um produto de origem italiana, mais popular na região sul do país, produzida de várias formas e com leite de vários mamíferos como o de vaca, cabra e búfala. É um produto suave e com textura delicada (KOSIKOWSKI; MISTRY, 1999; TEIXEIRA; BASTIANETTO; OLIVEIRA, 2005).

A ricota merece atenção especial em virtude do seu valor protéico, baixo teor de gordura, ausência ou poucas quantidades de sal e por constituir-se em um alimento leve e de fácil digestão, razão pela qual este queijo é mundialmente consumido em muitas dietas alimentares (RAIMUNDO, 2004; TEIXEIRA; BASTIANETTO; OLIVEIRA, 2005).

A principal matéria-prima para a fabricação de ricota é o soro de queijo, e por isso, também é conhecida como queijo albumina, por se constituir basicamente desta e de lactoglobulina, que são os principais componentes protéicos do soro e não são coaguláveis por coalho. São proteínas facilmente desnaturadas e precipitadas pelo calor, sob influência de acidificação, o que constitui o princípio básico da fabricação da ricota (SOUZA et al., 2000; UFSC, 2009). O aquecimento pode ser realizado de forma direta ou indireta (KOSIKOWSKI; MISTRY, 1999).

O soro proveniente da fabricação de queijos pode ser classificado em dois tipos, doce ou ácido. O soro doce é proveniente da coagulação enzimática do leite, ocasionada pela hidrólise das caseínas por enzimas proteolíticas de origem animal como, por exemplo, a renina, sendo obtido a partir de queijos como coalho, Andino, Minas, etc. O soro ácido provém do processamento de queijos Boursin, Pelardon, etc. sendo obtido a partir da coagulação ácida do leite após a transformação da lactose em ácido láctico por ação das bactérias lácticas presentes no leite cru ou no fermento lácteo adicionado após a pasteurização. De acordo com Haraguchi; Abreu; De Paula (2006) o soro apropriado para a fabricação de ricota é o proveniente da coagulação enzimática.

O soro de queijo é um subproduto da indústria de laticínios que apresenta boas propriedades funcionais e elevado valor nutritivo (proteínas e lactose), com superioridade em relação a outras proteínas para a nutrição humana, devido fundamentalmente ao perfil de aminoácidos da lactoalbumina. Considerando o valor nutricional do soro de queijo, principalmente no que se refere aos aminoácidos essenciais, este produto fornece quantidades significativas das necessidades de isoleucina, lisina, cistina, metionina, treonina, triptofano e valina (SIQUEIRA et al., 2002; HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006).

O soro, mesmo contendo substâncias de alto valor nutricional, se torna um grande problema para as indústrias de laticínios, por ser um resíduo. Possui alta concentração de matéria orgânica e, conseqüentemente, sujeito à rápida alteração pelos microrganismos, possuindo alta demanda biológica de oxigênio (DBO). Portanto, a fabricação de ricota é uma alternativa viável para transformar este subproduto em produto comercial, agregando valor e diminuindo seu efeito poluente (EGITO et al., 2007).

O soro utilizado no processamento deve ser fresco, e de preferência soro dos queijos Minas frescal, Minas padrão ou mussarela, já que o soro proveniente de queijos fabricados com corante resulta em um produto com coloração amarelada, o que não é característico para esse tipo de queijo. Ao soro (doce) é adicionado 5-10% (v/v) de leite a 60-65°C (melhorando dessa forma o rendimento e a consistência do produto final), opcionalmente adiciona-se sal 0,1% (p/v). Após atingir 85-90°C adiciona-se o agente acidificante (ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico ou fermento), ocorrendo a precipitação e, logo em seguida, a ascensão (arrastando outros elementos diluídos como caseína e gordura) das mesmas. A massa é então colocada em formas e levada para câmara fria onde fica por 6 a 24 horas. Normalmente, 1 kg de ricota pode ser obtida de 15 - 20 litros de soro (KOSIKOWSKI; MISTRY, 1999; MODLER; EMMONS, 2001; ESPER, 2006).

A ricota pode sofrer processo de defumação (ricota defumada) ou condimentação (ricota condimentada) (UFSC, 2009). A ricota defumada apresenta-se resistente frente às condições desfavoráveis do ambiente, do

transporte e da exposição à venda. O mesmo não acontece com a ricota fresca, devido ao seu elevado teor de umidade, fácil decesso durante o transporte e difícil acondicionamento sob condições higiênicas, tornando a sua conservação bastante problemática (RAIMUNDO, 2004).

De acordo com Esper (2006) a ricota possui um alto valor protéico (10 a 14%), baixo teor de gordura (4 a 5%), pH entre 4,9 a 6,1 e umidade entre 70-73%, o que a classificaria segundo a Portaria 146 de 07 de março de 1996 MAPA, como queijo magro de muita alta umidade (BRASIL, 1996). Por esta razão, a ricota se torna muito suscetível à contaminação microbiana e mesmo sendo armazenada sob refrigeração, acaba apresentando uma vida de prateleira muito limitada.

No Brasil, não existe um Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de ricota. A única legislação existente é o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) que no artigo 610 define a ricota como o produto obtido da albumina de soro de queijos, adicionado de leite até 20% do seu volume, tratado convenientemente, e tendo o máximo de três dias de fabricação. Também estabelece que este queijo deve apresentar formato cilíndrico, peso de 300g a 1 kg, crosta rugosa, não-formada ou pouco nítida, consistência mole, não-pastosa e friável, textura fechada ou com alguns buracos mecânicos, cor branca ou branco-creme, odor e sabor próprios (BRASIL, 1997).

3.2 Queijo ricota e a saúde pública

A ricota, embora acidificada e aquecida à 85-90°C é bastante suscetível ao ataque de microrganismos, e fatores como, sala de produção muito úmida, contaminação do ar acentuada, resfriamento lento, alta umidade do queijo e seu pH favorecem a contaminação e sobrevivência microbiana. Portanto, é imprescindível à implantação e execução das Boas Práticas de Fabricação, para obtenção de ricota de boa qualidade (KOSIKOWSKI; MISTRY, 1999).

De acordo com os padrões microbiológicos e sanitários para alimentos RDC nº 12 de 01/02/2001 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a ricota se enquadraria no grupo 8.b. item f, no qual os parâmetros para a amostra

indicativa são: máximo de 5×10^2 Unidade Formadora de Colônias / grama (UFC/g) para coliformes a 45°C e para estafilococos coagulase positiva e ausência para *Salmonella* sp/25g e *Listeria monocytogenes*/25g.

Esper (2006) avaliando 45 amostras de ricota comercializadas no município de Campinas observou que 46,7% das amostras estavam em desacordo com os parâmetros tolerados pela RDC 12/2001 da ANVISA, uma vez que foram positivas para *L. monocytogenes* e apresentaram contagem acima do limite para coliformes a 45°C e estafilococos coagulase positiva. Além dos critérios microbiológicos exigidos pela legislação, uma avaliação complementar mostrou que 51,1% das amostras estavam contaminadas com *Bacillus cereus*, sendo que 28,9% com contagem na faixa de 10^4 a 10^6 UFC/g e 85,7% (36/45) dos isolados analisados apresentavam potencial enterotoxigênico.

A análise de diferentes marcas de ricota comercializadas no município de Alfenas – MG mostrou que 83,3% das amostras estavam com contagens de coliformes termotolerantes acima do tolerado pela RDC nº12/2001-ANVISA (RAIMUNDO, 2004).

Nos Estados Unidos, segundo a *Food and Drug Administration* (FDA, 2004), em 2003 o Departamento de Agricultura da Geórgia (E.U.A) promoveu o recolhimento de 3 t de queijo ricota de uma marca específica devido à presença de *L. monocytogenes*. Um caso de listeriose causado pelo consumo de ricota foi registrado em *New Jersey* em 1999. As contagens deste microrganismo variaram entre 10^2 a 10^6 UFC/g nas amostras de ricotas envolvidas neste caso (RYSER; MARTH, 1999).

Na Itália, Cossedù et al. (1997) verificaram a presença de enterococos, microrganismos aeróbicos mesófilos e *Bacillus cereus* em 32 amostras de ricota, sendo que não encontraram *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp, *Salmonella* spp e *Escherichia coli*.

Gomes et al. (2008) isolaram *Enterococcus* spp. em diferentes tipos de alimentos (leite, produtos lácteos, incluindo a ricota, produtos cárneos, vegetais e água) e verificaram que das 139 cepas de *E. faecium* isoladas, 71,2% foram

obtidas a partir de amostras de queijo. Em relação à origem dos 80 isolados de *E. faecalis*, 51,3% destes foram provenientes de amostras de queijo.

3.3 Microrganismos previstos em queijos de muito alta umidade segundo a RDC 12/2001

3.3.1 Coliformes a 45°C

A denominação coliformes fecais foi utilizada durante muitos anos para descrever coliformes que fermentavam a lactose com produção de gás a 44,5°C. *Escherichia coli* e algumas cepas de *Klebsiella* e *Enterobacter* apresentam esta característica de termotolerância, porém, somente *E. coli* tem como habitat primário o intestino humano e de animais e, portanto, a sua presença nos alimentos constitui um indicador de contaminação fecal (PERESI et al., 2001).

Klebsiella e *Enterobacter* podem ser encontrados em outros ambientes, como vegetais e solo, onde persistem por tempo superior ao das bactérias patogênicas de origem intestinal (DOYLE, 1996). Logo, não é correta a relação direta da presença de coliformes termotolerantes em alimentos e água com contaminação de origem fecal, o que levou à necessidade de modificar, na legislação brasileira, a denominação coliformes fecais para coliformes a 45°C.

O Ministério da Saúde, através da Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001) adotou a denominação coliformes a 45°C, considerando os padrões “coliformes de origem fecal” e “coliformes termotolerantes” como equivalentes a coliformes a 45°C.

Os coliformes termotolerantes são membros da família *Enterobacteriaceae* e incluem os bastonetes curtos aeróbios e anaeróbios facultativos, Gram-negativos, catalase positiva e oxidase negativa que fermentam lactose a 45°C. A atividade de água mínima para seu crescimento é de 0,95, com pH ótimo em torno de 6,0 a 7,0, sendo o mínimo a 4,4 e o máximo a 9,0 (ICMSF, 1998; HOLT et al., 2000; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Em alimentos processados, a presença de um número considerável de coliformes ou *Enterobacteriaceae* indica processamento inadequado e/ou recontaminação pós-processamento, provenientes da matéria-prima, de equipamento sujo, ou manipulação sem cuidados de higiene, e indica também proliferação microbiana que poderia permitir a multiplicação de microrganismos patogênicos e toxigênicos (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Com relação à tecnologia dos queijos, os coliformes são responsáveis pelo desenvolvimento de estufamento precoce caracterizado pela produção de gás entre 1 a 2 dias após sua fabricação (FOX et al., 2000).

Algumas *Escherichia coli* produzem enterotoxinas e/ou outros fatores de virulência, incluindo fatores invasivos e de colonização que causam doenças diarréicas. As linhagens de *E. coli* consideradas patogênicas, com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiológicas podem ser agrupadas nas classes: enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC); enterohemorrágica (EHEC); enteroagregativa (EAggEC); enteroinvasiva (EIEC) e difusivamente adesiva (DAEC) (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

A *Escherichia coli* O157:H7 pertence ao grupo EHEC e é um dos microrganismos mais importantes em relação às doenças humanas veiculadas por alimentos. Essas linhagens caracterizam-se pela produção de uma toxina chamada de verotoxina (VT) ou "shiga-like" toxina (ST), similar à produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae* tipo I. A VT provoca uma doença chamada colite hemorrágica que, em casos mais graves, resulta em um quadro conhecido como síndrome urêmica hemolítica (HUS). Essas cepas diferem das demais cepas de *E. coli* em algumas características, sendo as mais importantes a não fermentação do sorbitol e a não produção da enzima β -glucuronidase e a dificuldade de se multiplicar ou não se multiplicam nas temperaturas normalmente empregadas para a pesquisa de *E. coli* em alimentos (44,5°C – 45,5°C) (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1995; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Aureli et al. (1992) verificaram que em 397 amostras comerciais de queijo fresco analisadas, 16,37% das cepas isoladas eram *E. coli*, e destas, 32,3% eram toxigênicas.

Pereira et al. (1999) constataram que 90% das amostras analisadas de queijo Minas frescal, 52% de queijo Minas padrão e 81,2% de canastra continham contagens de coliformes termotolerantes superiores aos limites tolerados na legislação vigente (ANVISA, 2001). Carvalho (2003) também constatou contagens de coliformes termotolerantes acima do limite tolerado pela legislação em 34,4% (93) das amostras de queijo Minas frescal analisadas.

Gonzales et al. (2000) analisaram 44 amostras comerciais de queijo Minas frescal, isolando 385 colônias de *E. coli*, das quais 5 eram enteropatogênicas.

3.3.2 Estafilococos coagulase positiva e negativa

As bactérias do gênero *Staphylococcus* se apresentam na forma de células esféricas, de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro que aparecem em pares, em cadeias curtas ou em cadeias irregulares na forma de cacho de uva. Estes microrganismos são Gram-positivos, anaeróbicos facultativos com maior crescimento em condições aeróbicas, catalase positiva e oxidase negativa, e não possuem motilidade. Geralmente toleram até 10% de sal a 37 °C e são os únicos microrganismos patogênicos a crescerem em valores de atividade de água inferiores aos considerados como mínimos para bactérias não halofílicas (FDA, 1998; HOLT et al., 2000).

Staphylococcus são amplamente distribuídos na natureza, sendo o homem e os animais os principais reservatórios. Geralmente, são encontrados em pêlos, pele, boca, narinas, glândulas mamárias, trato respiratório e intestinal destes hospedeiros (BANNERMAN, 2003). A cavidade nasal é o principal habitat de *Staphylococcus* no homem e, a partir deste foco atingem tanto epiderme como ferimentos, água, ar, solo, esgoto, plantas de processamento de alimentos, leite, e alimentos diversos.

Em geral, as espécies deste gênero têm uma relação benigna ou simbiótica com o hospedeiro, porém, por serem bactérias oportunistas, certas espécies são freqüentemente agentes etiológicos de várias infecções no homem e nos animais. A espécie *S. aureus* é a que está associada mais freqüentemente a doenças estafilocócicas, quer sejam de origem alimentar ou não. Estima-se que entre 30 a 50 % da população humana seja portadora desta bactéria (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

S. aureus causa intoxicação provocada pela ingestão do alimento que apresenta a toxina pré-formada, logo o agente causal, são as várias toxinas (A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H, I e J) produzidas por esta bactéria, conhecidas como enterotoxinas. As toxinas são proteínas de baixo peso molecular, resistentes à cocção e às enzimas proteolíticas. Sabe-se ainda que as espécies de *S. intermedius* e *S. hyicus* também são capazes de produzir tais toxinas (FRANCO; LANDRGRAF, 2002; SÁNCHEZ et al., 2002).

A intoxicação estafilocócica é uma enfermidade transmitida por alimentos quando estes estão contaminados por espécies de estafilococos capazes de produzirem enterotoxinas. Relata-se ser necessária entre 10^5 e 10^6 UFC de *S. aureus*/g de alimento, para que a enterotoxina seja formada em quantidades capazes de provocar intoxicação alimentar. Os principais sintomas da intoxicação são: náuseas, vômitos, diarreias, sudorese, câibras abdominais dolorosas, dores de cabeça e calafrios. O período de incubação varia de 30 minutos a 8 horas, após a ingestão do alimento contaminado (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Na Itália, no período de 2000 a 2002, Normanno et al. (2005) investigaram a presença de estafilococos coagulase positiva e *S. aureus* em 9.869 amostras de vários produtos de origem animal, sendo 3.097 de leite (leite cru e leite pasteurizado) e derivados (queijo, coalhada, ricota, sorvetes e outros produtos lácteos). A presença de estafilococos coagulase positiva foi constatada em 21% (641) das amostras avaliadas. Dentre os 364 isolados obtidos, 362 foram identificados como *S. aureus*, e destes 217 (59,9%) eram enterotoxigênicos.

Carmo et al. (2002) coletaram amostras de queijos e leite cru relacionados à dois surtos em Minas Gerais. No primeiro surto, 50 pessoas adoeceram após a ingestão de queijo Minas frescal, e no segundo surto, 328 pessoas apresentaram os sintomas após ingestão de leite cru. As análises mostraram que *S. aureus* estava presente ($2,4 \times 10^2$ a $2,0 \times 10^8$ UFC/g) e produziu as enterotoxinas SEA, SEB e SEC.

Várias condições estão associadas ao crescimento e produção de estafilococos e suas enterotoxinas, como refrigeração inadequada, preparo de alimentos por tempo prolongado, higiene pessoal deficiente, aquecimento e cozimento inadequado (SORIANO et al., 2002).

Segundo o ICMSF (1998) o *S. aureus* é muito resistente a temperaturas de congelamento, sobrevivendo em alimentos estocados até -20°C . Ele não resiste a temperaturas de pasteurização, porém é capaz de produzir toxinas altamente estáveis ao aquecimento.

A produção de enterotoxinas sempre foi atribuída exclusivamente ao *S. aureus*, espécie coagulase positiva (BENNET, 1996). Em 2001, a legislação brasileira de padrões microbiológicos para alimentos alterou a determinação de *S. aureus* para enumeração de “estafilococos coagulase positiva”, devido à correlação entre a produção de coagulase e a capacidade enterotoxigênica, (BRASIL, 2001).

Entretanto, além de espécies de estafilococos coagulase positiva, algumas espécies coagulase negativa possuem capacidade de produção de enterotoxinas como foi evidenciado em meio de cultivo laboratorial (PEREIRA, 1996; OLIVEIRA, 1999; PEREIRA; PEREIRA, 2005). Algumas das espécies coagulase negativa relatadas como produtoras de enterotoxinas em meio de cultivo laboratorial foram: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus* e *S. xylosus* (PEREIRA; PEREIRA 2005).

Surtos de intoxicações estafilocócicas associados a espécies coagulase negativas já foram relatados. O primeiro deles ocorreu em 1959 em Osaka, no Japão, associado ao consumo de leite. Nos Estados Unidos, a espécie *S.*

epidermidis produtora de SEA foi incriminada em um surto envolvendo carne assada. No Brasil, um surto ocorreu devido ao consumo de queijo Minas frescal e leite cru, onde foi identificada a espécie *S. epidermidis* produtora de SEC (BRECKINRIDGE; BERGDOLL, 1971; CARMO et al., 2002, VERAS et al., 2003).

3.3.3 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* é constituído por bactérias em forma de bastonetes Gram positivos, não formadora de esporos, anaeróbia facultativa, móvel com flagelos peritríquios, catalase positiva, oxidase negativa. Apresenta crescimento entre temperatura de 2,5 à 44°C sendo capaz de se desenvolver sob refrigeração, e podendo proliferar em alimentos mantidos nessas condições. A faixa de pH para seu desenvolvimento varia de 4,5 a 9,5 (ICMSF, 1998; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

O gênero *Listeria* está dividido em sete espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*. A *L. innocua* e *L. grayi* são consideradas não patogênicas, enquanto *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. welshimeri* raramente causam infecção em humanos (ICMSF, 1998).

Listeria monocytogenes é um dos microrganismos patogênicos de maior severidade à saúde humana. Ela tem sido associada à vários surtos de origem alimentar, e tem como veículo, o ambiente e alimentos (vegetais, carnes, leite e derivados) destacando-se os queijos (LONCAREVIC et al., 1998).

A listeriose é uma doença causada pela ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes*. São descritas duas formas de manifestação clínica da doença, a listeriose invasiva e a listeriose gastrintestinal (não invasiva). A listeriose invasiva é uma doença severa, pois a taxa de mortalidade é alta (20 a 30%), principalmente para pessoas susceptíveis a adquirir a infecção, como gestantes, recém nascidos, idosos, pacientes submetidos a hemodiálise e a terapias prolongadas, indivíduos com sistema imunológico deprimido (SWAMINATHAN, 2001), enquanto a listeriose não invasiva pode causar

infecções suaves semelhantes a uma gripe, em indivíduos saudáveis, até surtos de gastroenterite febril, mas normalmente não evolui para óbito (CARRIQUE-MAS et al., 2003; GAHAN; HILL, 2005).

O período de incubação da listeriose varia de horas a semanas, sendo que a dose infectante de *L. monocytogenes* para causar a doença ainda não está bem definida. A dose aproximada, relatada de casos, varia de 10^3 a 10^9 UFC/g ou mL (DALTON et al., 1997), mas há relatos de surtos com contaminação extremamente baixa (<0,3UFC/g) (MEAD et al., 1999). A dose infecciosa também varia em função da virulência da cepa e da suscetibilidade do indivíduo (SWAMINATHAN, 2001). Os sintomas mais comuns são febre, fadiga, mal-estar, podendo haver ou não presença de náusea, vômito, dores e diarreia. Em casos mais graves, ocorre meningite, meningoencefalite, encefalite, septicemia. Em indivíduos saudáveis, a doença é pouco freqüente e manifesta-se como gastroenterite caracterizada por febre, vômitos, dor abdominal e diarreia (DONELLY, 2001).

Devido à severidade das infecções de *L. monocytogenes*, em que a taxa de mortalidade pode alcançar cerca de 50% e por não ser conhecida ainda a dose mínima infectiva, o *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA estabeleceu o padrão de “tolerância zero” para o microrganismo em alimentos prontos para consumo. Os padrões microbiológicos da legislação brasileira estabelecem para alguns produtos ausência em 25g de alimento, como é o caso da ricota (ALMEIDA; ALMEIDA; RODRICK, 1999; BRASIL, 2001).

A ocorrência de *L. monocytogenes* em leites e produtos lácteos tem sido relatada em muitos estudos. Entre os produtos lácteos, os queijos são os mais comumente contaminados por esta bactéria, principalmente os de média e alta umidade. A contaminação de queijos por *L. monocytogenes* está relacionada com a contaminação do leite cru, o que pode ocorrer durante o processo de ordenha, estocagem, transporte até a indústria e a partir do ambiente de processamento (TOMPKIN, 2002; KABUKI, 2004).

Silva; Hofer; Tibana (1998) analisaram 103 amostras de queijos brasileiros obtidos no comércio do Rio de Janeiro e verificaram que, 10,68% estavam

contaminadas com *L. monocytogenes*, 12,62% com *L. innocua*, 5,83% com *L. grayi* e 0,97% com *L. welshimeri*.

Nos Estados Unidos, segundo a FDA, um surto de listeriose foi registrado em *New Jersey* (1999), causado pelo consumo de ricota, com contagens que variavam de 10^2 a 10^6 UFC/g (RYSER, MARTH, 1999).

Também nos Estados Unidos entre o período de 2000 – 2001 um surto foi associado ao consumo de queijo fresco tipo Mexicano de fabricação caseira onde se utilizou leite cru. Doze pessoas foram acometidas pela doença (incluindo 10 gestantes), provocando 5 abortos, 3 partos prematuros, 2 recém nascidos infectados, um adulto acometido por meningite e outro desenvolvendo abscesso cerebral (CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION, 2001).

Kabuki (2004) analisou 246 amostras do ambiente de produção de queijo fresco (tipo latino) e 111 amostras do queijo, encontrando *L. monocytogenes* em 11,0% das amostras do ambiente e em 6,3% dos queijos. Todos os queijos foram fabricados com leite pasteurizado.

Quando a bactéria é isolada no alimento, geralmente é devido a contaminações pós-processamento ou falha no processo de pasteurização (ESPER, 2006).

Devido aos problemas relacionados aos produtos lácteos, é grande a preocupação com o comportamento desse microrganismo no processamento e estocagem desses produtos, pois o ambiente das plantas de processamento permite a colonização da bactéria em vários pontos. Assim, é evidente a importância dos programas de Boas Práticas de Fabricação e Procedimentos Operacionais Padronizados, particularmente aqueles envolvendo os processos de limpeza e desinfecção, no controle do microrganismo (KABUKI, 2004).

3.3.4 *Salmonella* spp.

Salmonella, um gênero da família *Enterobacteriaceae*, compreende bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, móveis por flagelos peritríquios, que fermentam glicose, mas não lactose e sacarose,

geralmente produzindo gás e H₂S, são oxidase negativa e catalase positiva (ICMSF, 1998). A temperatura ótima para multiplicação de *Salmonella* é próxima à 35-37°C.

As doenças causadas por *Salmonella* são divididas em três grupos: febre tifóide (causadas por *Salmonella* Typhi), febre entérica (causadas por *Salmonella* Paratyphi) e as enterocolites ou salmoneloses, causadas pelas demais salmonelas. Atualmente, *Salmonella* é um dos microrganismos mais relatados em surtos de origem alimentar, principalmente envolvendo carnes bovinas, aves e ovos. Em relação aos laticínios a contaminação é quase sempre causada por leite cru ou inadequadamente pasteurizado (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

O mecanismo de patogenicidade se desenvolve pela penetração e passagem da *Salmonella* do lúmen intestinal para dentro do epitélio que reveste a parede intestinal, onde ocorre inflamação. O tempo de incubação é de 6-48 horas, seguido pelo início dos sintomas agudos, como náusea, vômito, cãibra abdominal, diarreia, febre e dor de cabeça. Algumas conseqüências crônicas, como sintomas de artrite, podem persistir por 3-4 semanas após o início dos sintomas agudos (ICMSF, 1998).

A dose infectiva pode ser de poucas células (15-20), dependendo da idade, saúde do hospedeiro e da espécie envolvida. Todas as pessoas são suscetíveis a infecção causada por *Salmonella*, porém os sintomas podem ser mais severos em crianças, idosos e imunodeprimidos (KAUFMANN; RAUPACH; FINLAY, 2001).

Vários surtos de salmonelose, ligados ao consumo de queijos contaminados, têm sido atribuídos ao controle deficiente durante o processamento do queijo ou ao uso de leite contaminado (ICMSF, 2000).

Nos Estados Unidos, em 1985, ocorreu um dos maiores surtos de salmonelose já notificado. Este surto envolveu 16.000 casos confirmados em seis estados, decorrentes da ingestão de leite integral e desnatado de uma indústria de laticínios de Chicago. Modificações no pasteurizador para acelerar a passagem do leite cru resultaram em uma pasteurização inadequada (FDA, 1998).

Peresi et al. (2001) analisaram 30 amostras de queijo Minas frescal artesanal comercializadas em feiras livres de São José do Rio Preto e constataram em 6,7 % das amostras artesanais a presença de *Salmonella*.

Carmo et al. (2005) avaliaram o perfil epidemiológico dos surtos de DTA ocorridas no país, no período de 1999 a 2004, e constataram notificação de 3.064 surtos, com o acometimento de 57.353 pessoas e registro de 37 mortes. *Salmonella* foi o agente etiológico mais freqüente nos surtos, sendo detectada em 41% dos casos com identificação etiológica.

Embora a análise microbiológica de queijos industrializados raramente resulte no isolamento de *Salmonella*, este microrganismo pode crescer durante a fabricação e sobreviver em vários queijos por mais que 60 dias (ICMSF, 1998), o que ressalta a importância do controle de qualidade microbiológico do produto, visto que a Legislação Brasileira estabelece ausência desta bactéria em alimentos (BRASIL, 2001).

3.4 *Bacillus cereus* em queijos

3.4.1 Características da espécie *B. cereus*

Bacillus cereus é uma bactéria que pertence à família *Bacillaceae*, Gram-positiva, aeróbia, móvel por meio de flagelos peritríquios, produtora de esporos termorresistentes, que podem ser centrais ou subterminais. Cepas de *B. cereus* são capazes de utilizar vários carboidratos: glicose, frutose, trealose, sacarose, salicina, maltose, manose, m-inositol e lactose. São capazes de hidrolisar amido, caseína e gelatina. Suas cepas são catalase positiva e oxidase variável. A esporulação aeróbia e a reação de catalase positiva as distinguem do gênero *Clostridium* (NOTERMANS; BATT, 1998; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Estes microrganismos sobrevivem a várias condições ambientais, devido à sua condição de formar endosporos resistentes ao calor, agentes químicos, desidratação e desinfetantes. São geralmente mesófilos, com temperatura ótima de crescimento variando de 25 a 37°C, embora pesquisas tenham demonstrado

que cepas de *B. cereus*, possuem a capacidade de crescer à temperatura abaixo de 7°C, com algumas cepas psicrotróficas crescendo até a 4°C, e outras com características termofílicas, podendo crescer até a 75°C. Multiplicam-se na faixa de pH entre 4,3 a 9,3 (FRANCO; LANDGRAF, 2002; SCHOENI; WONG, 2005).

O *B. cereus* é um microrganismo que se encontra amplamente distribuído no meio ambiente, sendo o solo seu reservatório natural, por esta razão contamina facilmente a vegetação, cereais e derivados de cereais, alimentos, águas naturais, leite, produtos lácteos e condimentos (CÂMARA, 2002; RAJKOWSKI; BENNETT, 2003).

3.4.2 Identificação de *B. cereus*

A identificação de *B. cereus* é realizada através de provas morfológicas e bioquímicas, cujas características observadas são: bastonete Gram positivo produtor de lecitinase, negativo para fermentação de manitol em ágar MYP (Mannitol Yolk Polymixin), capaz de utilizar glicose anaerobicamente, redutor de nitrato a nitrito, capaz de decompor L-tirosina e de crescer na presença de 0,001% de lisozima, móvel, produtor de hemólise, não produtor de cristais de endotoxina e negativo para crescimento rizóide (BENNETT; BELAY, 2001).

Devido às características morfofisiológicas das espécies de *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis* serem muito semelhantes entre si (não fermentadoras de manitol, crescimento em presença de lisozima, fermentadoras de glicose em anaerobiose, redutoras de nitrato, etc.) em relação às demais do mesmo gênero, são denominadas normalmente como bactérias do grupo *B. cereus* ou Grupo 1A. Todas as cepas pertencentes ao grupo *B. cereus* são produtoras de lecitinase, sendo que as demais do grupo 1 (*B. subtilis*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* e *B. pumilus*) são lecitinase-negativas (STADHOUDERS, 1992).

A não-formação de ácido a partir de D-manitol e sua produção a partir de glicose em anaerobiose, além de crescimento na presença de lisozima são propriedades características do grupo *B. cereus*, não se aplicando via de regra a

outras espécies do grupo 1, que possuem características variáveis (STADHOUDERS, 1992).

Devido às espécies de *Bacillus* do Grupo 1A apresentar alta similaridade nas suas características (**Tabela 1**), várias técnicas baseadas em biologia molecular têm sido desenvolvidas e aplicadas para a caracterização tanto das enterotoxinas quanto para diferenciação dessas espécies de *Bacillus*. Estas técnicas, como por exemplo, fagotipagem, amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD) e reação da polimerase em cadeia (PCR), tem sido importantes instrumentos para o estudo e diferenciação destes microrganismos (GUELARDI et al., 2002).

Tabela 1. Características diferenciais das espécies de *Bacillus* spp. pertencentes ao Grupo 1A

Característica	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. mycooides</i>	<i>B. anthracis</i>
Coloração de Gram	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Motilidade	+/-	+/-	-	-
Redução do nitrato	+	+	+	+
Decomposição da tirosina	+	+	+/-	d
Resistência à lisozima	+	+	+	+
Reação de gema de ovo	+	+	+	+
Utilização anaeróbica da glicose	+	+	+	+
Voges-Proskauer (VP)	+	+	+	+
Ácido a partir de manitol	-	-	-	-
Hemólise	+	+	+	d
Outras características conhecidas	Produz enterotoxinas	Produz cristais de endotoxinas	Crescimento rizóide	Patogênico para o homem e outros animais

+ = 90 – 100% das cepas positivas; +/- = 50 – 50% das cepas positivas; - = 90 – 100% das cepas negativas; d = maioria das cepas negativas.

Fonte: FDA (2001).

3.4.3 Patogenicidade de *B. cereus*

Os fatores de virulência do *B. cereus* estão relacionados com a produção de várias toxinas extracelulares, entre elas uma toxina diarreica termolábil, que é

inativada em cinco minutos a 56° C e uma toxina termoestável de ação emética que se mantém inalterada após uma hora a 120°C. Podem apresentar duas formas clínicas: a síndrome diarréica e a emética (CÂMARA, 2002).

A síndrome diarréica caracteriza-se por um período de incubação que varia de oito a dezesseis horas e seus principais sintomas são: diarréia intensa, dores abdominais, tenesmos retais, raramente ocorrendo náuseas e vômitos. A duração da doença é de doze a vinte e quatro horas; geralmente está associada ao consumo de alimentos de composição protéica, contaminados com aproximadamente 10⁶ UFC/g. Estes microrganismos podem fazer parte da flora fecal, dependendo do tipo de alimento e da sazonalidade, principalmente no verão; entretanto não coloniza o intestino, não persistindo por longos períodos (FRANCO & LANDGRAF, 2002; JAY, 1992).

A síndrome emética caracteriza-se por um período de incubação curto, de uma a cinco horas, causando vômitos, náuseas e mal estar geral, com seis a vinte e quatro horas de duração. Esta síndrome está associada a alimentos com alto teor de amido e que contenham número elevado de microrganismos viáveis de *B. cereus* (maior ou igual a 10⁶UFC/g) (CÂMARA, 2002).

Várias pesquisas têm sido realizadas a fim de se isolar e caracterizar as enterotoxinas. Entretanto, ainda permanecem dúvidas quanto à estrutura, tamanho e número de componentes dos fatores tóxicos (DUFRENNE et al., 1994; ANDERSSON; RONNER; GRANUM, 1995; LUND; GRANUM, 1996; GIFFEL et al., 1997; SVENSSON et al., 1999; GUINEBRETIÉRE; BROUSOLE; THE, 2002).

Atualmente, são conhecidas quatro enterotoxinas produzidas por *B. cereus*: a hemolisina BL (*HBL*), a enterotoxina não-hemolítica (*NHE*), a enterotoxina K (*CytK*) e enterotoxina T (*BceT*). As três primeiras já foram identificadas em surtos alimentares. O complexo *HBL* é formado por três componentes denominados *B*, *L1* e *L2* com pesos moleculares de 35, 36 e 45 kDa, respectivamente. Este complexo requer os três componentes para tornar máximas as atividades hemolíticas, citotóxicas e dermonecroticas, a ação de permeabilidade vascular e

acúmulo de fluido em alças intestinais de coelho (GUINEBRETIERE; BROUSOLE; THE, 2002; SCHOENI; WONG, 2005).

O complexo *NHE* (*nonhemolitic enterotoxin*) é composto por três proteínas denominadas *nheA*, *nheB* e *nheC*, com pesos moleculares de 39, 45 e 105 kDa, respectivamente. As três proteínas são necessárias para a máxima atividade citotóxica, embora a combinação de duas delas em elevados níveis, já seja suficiente para promover a atividade citotóxica (LUND, GRANUM, 1996; SCHOENI; WONG, 2005).

A habilidade do *B. cereus* em produzir *NHE* é mais comum, com 92 a 100% dos isolados com capacidade de produzi-lo (SCHOENI; WONG, 2005). Em geral as cepas de *B. cereus* são capazes de produzir *NHE*; entretanto, apenas cerca de 50% de *HBL* são detectados (HANSEN; HENDRIKSEN, 2001).

3.4.4 Surtos de intoxicação alimentar por *B. cereus*

B. cereus tem sido responsável por cerca de até 10% dos casos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) relatados na literatura brasileira (**Tabela 2**).

Tabela 2. Surtos de intoxicação alimentar por *B. cereus* no Brasil

Período	Estado	Surtos de toxinfecção alimentar (%)	Referência
1991 -1998	Minas Gerais	3,5	Martins Vieira et al. (1998)
1978 - 1997	Paraná	4,3	Camargo et al. (1998)
1998 - 2001	Mato Grosso do Sul	10,3	Câmara (2002)

Nos Estados Unidos durante o período de 1993 a 1997 o número de surtos documentados causados por *B. cereus* e espécies afins é apresentado na **Figura 1**. Uma das dificuldades na investigação de doenças transmitidas por alimentos é que os sintomas das pessoas atingidas podem ser semelhantes aos sintomas causados por outros agentes etiológicos. Os sintomas da síndrome diarréica por

B. cereus imitam as características clínicas de *C. perfringens*, enquanto os sintomas provocados pela toxina emética não são diferentes daqueles da intoxicação estafilocócica. Como consequência desses paralelos assintomáticos, é imperativo que os exames laboratoriais sejam realizados completamente (RAJKOWSKI; BENNETT, 2003).

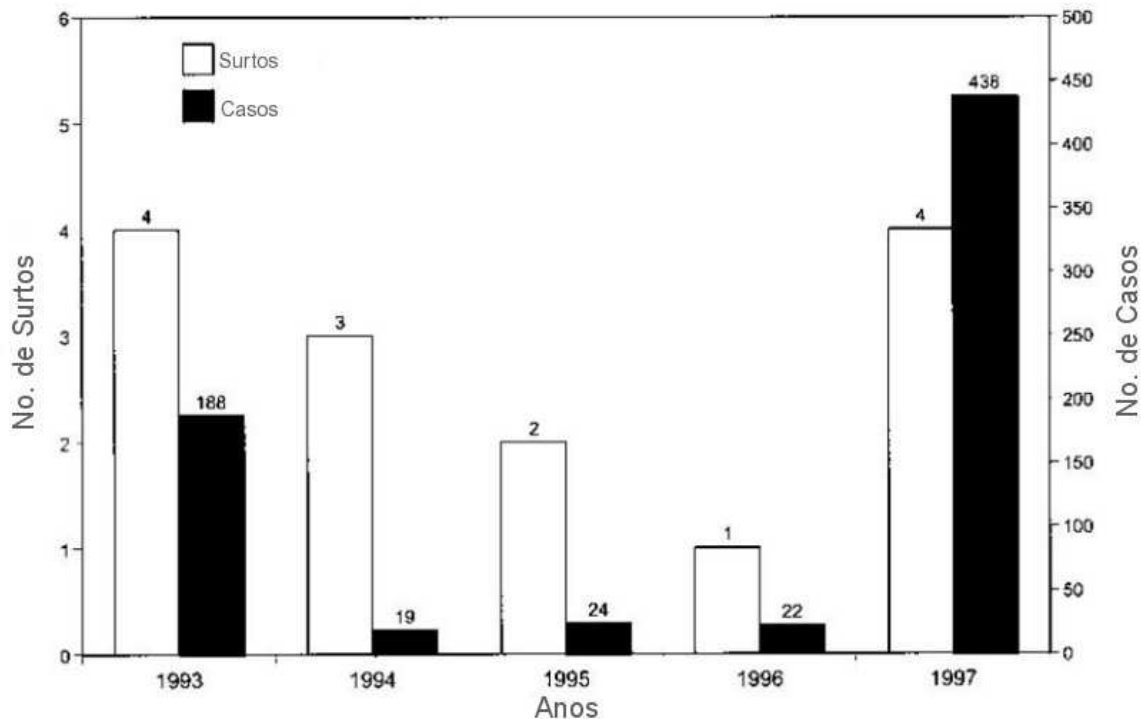


Figura 1. Números comparativos de surtos e casos causados por *Bacillus cereus* nos Estados Unidos entre o período de 1993-1997.

Fonte: RAJKOWSKI; BENNETT (2003).

As causas mais freqüentes atribuídas a surtos de intoxicação alimentar por *B. cereus* nos Estados Unidos entre o período de 1993 e 1997 são apresentadas na **Tabela 3**. A grande preocupação para a indústria de alimentos e varejista na prevenção de surtos de intoxicação alimentar deve ser a utilização efetiva da análise dos perigos e pontos críticos de controle (APPCC) por todos os que estão

envolvidos na colheita, produção, distribuição, armazenamento e serviços de alimentação (RAJKOWSKI; BENNETT, 2003).

Tabela 3. Principais causas de surtos de intoxicação alimentar por *Bacillus cereus* nos Estados Unidos, 1993-1997

Causa	Número de surtos
Temperatura inadequada de conservação	10
Aquecimento inadequado	3
Equipamento contaminado	2
Alimentos de fonte insegura	0
Falta de higiene pessoal	2
Outros	1

Fonte: RAJKOWSKI; BENNETT (2003).

Mendes et al. (2004) avaliaram a contaminação ambiental por *B. cereus* em uma unidade de alimentação e obtiveram uma contagem de até 60 UFC/cm². Tal contagem foi observada exatamente em uma bancada localizada no setor de pré-preparo de vegetais, local onde se manipulam alimentos que, na maioria das vezes, não recebem tratamento térmico de acabamento.

Soares (2004) avaliou a contaminação ambiental por *B. cereus* em dois restaurantes institucionais e constatou, no restaurante 1, contagens compreendidas entre 0,07 e 2,20 UFC/cm² de *B. cereus* nas bancadas utilizadas para a manipulação de carnes processadas.

Rocha (2004) observou um grau de contaminação elevado em indústria processadora de queijo Minas frescal em vários locais de amostragens, destacando-se a contagem de *B. cereus* em torno de 10³ UFC/cm² em pisos, paredes, drenos, bomba de transporte de soro e bandejas. A contagem deste microrganismo na lira de inox chegou a 10⁵ UFC/cm².

3.5 *Enterococcus* spp. em queijos

3.5.1 Características do gênero *Enterococcus*

Bactérias do gênero *Enterococcus* ou enterococos (anteriormente estreptococos “fecal” ou grupo D de Lancefield) pertencem ao grupo das bactérias ácido-láticas, Gram-positivo, não esporogênicas. Anaeróbicos facultativos fermentam carboidratos produzindo predominantemente ácido láctico, sem a produção de CO₂ (metabolismo homofermentativo). Esses microrganismos não possuem enzimas do citocromo, apresentando em sua maioria resultado negativo quando submetidos a testes como o da catalase; porém, ocasionalmente produzem uma pseudo-catalase, podendo apresentar um fenótipo catalase positivo. A morfologia é de cocos, que ocorrem predominantemente aos pares ou pequenas cadeias (MURRAY, 1990; FRANZ; HOLZAPFEL; STILES, 1999; GIRAFFA, 2002; SILVA et al., 2007; GAMA, 2008).

Atualmente, o gênero *Enterococcus* inclui mais de 20 espécies, sendo o *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* as duas espécies freqüentemente encontradas nos alimentos. Os enterococos podem estar presentes no solo, na superfície das águas, em plantas e vegetais. Podem crescer em alimentos crus e multiplicar-se durante as fermentações, devido a sua habilidade em sobreviver em condições extremas de pH, temperatura e salinidade (GIRAFFA, 2003).

Os enterococos são mesófilos e sua temperatura ótima de crescimento é de 35°C, entretanto, crescem em ampla variedade de temperaturas entre 10 e 45°C e podem sobreviver durante 30 minutos a 60°C, bem como suportar amplas variações de pH, sendo resistentes as condições normais de processamento. A maioria também é relativamente resistente ao congelamento. Crescem em meios contendo elevadas concentrações de NaCl e 40% de sais biliares, a maioria das espécies hidrolisa o substrato pirrolinodil-β-naftilamida (PYR). Todas as linhagens produzem enzima leucina-aminopeptidase (LAP) (FRANZ; HOLZAPFEL; STILES, 1999; SILVA et al. 2007; GAMA, 2008).

3.5.2 Fontes de *Enterococcus*

A contagem de enterococos em queijos (*typo-mediterran*) pode variar entre 10^4 e 10^7 UFC/g de queijo e seu crescimento é facilitado já que estes microrganismos podem crescer em ambientes altamente salgados e com baixo pH. A prevalência de enterococos em derivados do leite ocorre pelas condições não-higiênicas durante o processo de coleta e processamento (como contaminação pelo animal ou fezes humanas), ou ainda fontes de água, aparelhos de coleta do leite ou tanques de armazenamento da massa, juntamente à sua resistência a temperaturas de pasteurização e a sua habilidade de crescimento em diferentes substratos e condições adversas (RIBOLDI, 2007).

A presença de enterococos em queijo pasteurizado é geralmente devido à recontaminação após tratamento térmico e a sua resistência, podendo tornar-se um problema de deterioração em queijo (GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997; SUZZI et al., 2000).

E. faecalis é considerado a espécie de *Enterococcus* mais comum nas fezes dos humanos, ocorrendo em até 10^5 - 10^7 UFC/g de fezes. Em contrapartida, *E. faecium* é a espécie mais comum encontrada no trato intestinal de gado leiteiro (GELSOMINO et al., 2001; FRANZ et al., 2003).

No entanto, apesar de alimentos fermentados contendo enterococos terem uma longa história de utilização segura, a presença de enterococos nos alimentos é de grande preocupação para a indústria de alimentos e os consumidores. Com efeito, os enterococos são considerados como patógenos emergentes dos seres humanos e são muitas vezes associadas a infecções hospitalares (FRANZ; HOLZAPFEL; STILES, 1999).

Santos; Souza; Oddi (2004) analisaram a ocorrência de *Enterococcus* spp. em amostras de alimentos enterais administrados em ambiente hospitalar e observaram através das características bioquímicas que das 30 amostras industrializadas e artesanais, 16,6% estavam contaminadas com *Enterococcus* spp. e que a sua presença indicava práticas inadequadas de manipulação.

3.5.3 Patogenicidade de *Enterococcus* spp.

As características que tornam certas bactérias patogênicas são conhecidas como fatores de virulência. Este termo se refere às substâncias produzidas pelos microrganismos, que podem causar danos ao hospedeiro. O termo passou a significar qualquer componente do microrganismo que seja exigido para provocar doença ou potencialize sua capacidade para isso. Características que determinam virulência em linhagens de enterococos são, entre outros: a aderência ao tecido do hospedeiro, invasão e formação de abscesso, modulação da resposta inflamatória e secreção de produtos tóxicos. Dependendo do tipo e combinação desses fatores, estes se tornam determinantes para a patogenicidade da cepa (GAMA, 2008).

Os enterococos são microrganismos comensais que atuam como patógenos oportunistas principalmente em idosos, pessoas com doença grave, imunocomprometidas, hospitalizadas por longos períodos ou que fazem uso de terapia antimicrobiana de amplo espectro. Nos Estados Unidos, os enterococos tornaram-se o segundo microrganismo comumente isolado do trato urinário e de feridas, e a terceira etiologia mais comum de bacteremia hospitalar (HÖRNER et al., 2005).

De acordo com Gama (2008), as infecções do trato urinário são os processos mais comuns causados por este microrganismo, entre eles destacam-se cistites, prostatites, epididimites, que acometem idosos. Entretanto, as infecções do trato urinário (ITU) são mais comuns em pacientes hospitalizados por longos períodos ou que fazem uso de terapia antimicrobiana durante muito tempo, e desta forma são normalmente resistentes a um grande número de antibióticos. Enterococos é responsável por 15% de ITU's nosocomiais.

Os enterococos por fazerem parte da microbiota intestinal normal possuem maior probabilidade de adquirir marcadores de resistência aos antimicrobianos e/ou fatores de patogenicidade do que outros cocos Gram-positivos. O desenvolvimento do aumento da ocorrência ou incidência do fenótipo de resistência pode ocorrer através da aquisição de genes determinantes de

resistência (em plasmídeos ou transposons a partir de outros microrganismos) ou devido a mutações cromossômicas espontâneas (KAYSER, 2003).

Os enterococos possuem mecanismos de transferência genética altamente efetivos, incluindo a conjugação e transposição conjugativa. Genes de virulência são conhecidos por estarem associados à plasmídeos altamente transmissíveis. O processo de conjugação utilizado por plasmídeos é bastante desenvolvido e envolve um processo de sinalização sofisticado. Cepas suscetíveis ao processo de conjugação secretam pequenas moléculas de peptídeos sinalizadores conhecidos com *sex pheromones*. Estes peptídeos induzem o gene a permitir a produção de substância de agregação em células capazes de doar o plasmídeo, resultando em um fenótipo de agregação celular (RIBOLDI, 2007).

Entre os enterococos, *E. faecalis* é responsável pela maioria das infecções em humanos (mais de 80%), enquanto que *E. faecium* é a segunda em números e apresenta uma frequência muito menor (abaixo de 10%), porém é altamente significativa devido à sua alta taxa de resistência a múltiplos agentes antimicrobianos (MURRAY, 1990; FRANZ et al., 2003; RIBOLDI, 2007).

As infecções em humanos costumam envolver a transmissão de pessoa para pessoa ou por transferência da microbiota endógena do paciente, mas os microrganismos podem ser provenientes do ambiente hospitalar, em particular os enterococos resistentes à vancomicina; porém, alguns pesquisadores mostraram o oposto. Os enterococos patogênicos podem ser adquiridos através do consumo de água ou alimentos contaminados, incluindo leite contaminado e produtos lácteos (ÇITAK; YUCEL; ORHAN, 2004; MURRAY; TOROS, 2004).

Uma vez que alimentos contaminados com linhagens de enterococos sejam consumidos, estas podem naturalmente ser transmitidas de alimentos para o trato gastrointestinal de humanos. O estudo de Gelsomino et al. (2001) em uma fazenda produtora de laticínios revelou a presença de três clones com as mesmas características genotípicas (sendo 1 *E. faecalis* e 2 *E. casseliflavus*) em cepas isoladas de fezes de humanos e alimentos (leite e queijo). Além disso, também foram encontradas cepas nos tanques de estocagem e equipamentos de ordenha,

concluindo-se que a presença deste microrganismo em queijo e leite ocorreu devido à contaminação dos equipamentos e, em humanos, pelo consumo destes produtos.

Existem outros fatores de virulência que também podem ser adquiridos por trocas genéticas, dentre eles: substância de agregação (*as*), gelatinase (*gelE*), proteína de superfície de enterococos (*esp*), citolisinas (*cyl*) e adesinas (*ace*) (GAMA, 2008). A **Tabela 4** descreve resumidamente estes fatores de virulência e seu modo de ação.

Tabela 4. Fatores de virulência de enterococos e seu modo de ação

Fatores de virulência	Modo de ação
Hemolisina	Lisa eritrócitos de humanos, cavalos e coelhos
Citolisina (<i>cyl</i>)	Toxina que causa ruptura da membrana dos glóbulos vermelhos e diversas outras células humanas
Substância de agregação (<i>as</i>)	Contribui para a formação de agregados celulares, facilitando a troca de material genético entre as células bacterianas
Proteína de superfície (<i>esp</i>)	Formação de biofilmes
Gelatinase (<i>gelE</i>)	Indução de processos inflamatórios
Adesina de colágeno (<i>ace</i>)	Adesão no colágeno

Fonte: FRANZ; HOLZAPFEL; STILES (1999); GOMES (2007); GAMA, (2008).

A **Tabela 5** mostra os valores encontrados para os fatores genotípicos de virulência entre *E. faecium* e *E. faecalis* avaliados no estudo de Gomes et al. (2008).

Tabela 5. Prevalência dos fatores genotípicos de virulência entre *E. faecium* e *E. faecalis* obtidos de amostras de queijos no Brasil

	N° de isolados	Prevalência (%)					
		<i>esp</i>	<i>gelE</i>	<i>ace</i>	<i>as</i>	<i>efaA</i>	<i>cylA</i>
<i>E. faecium</i>							
Queijos	99	0 (0,0)	26 (26,3)	1 (1,0)	0 (0,0)	72 (72,7)	0 (0,0)
<i>E. faecalis</i>							
Queijos	41	3 (73,0)	39 (95,1)	41 (100,0)	11 (26,8)	40 (97,5)	0 (0,0)

esp: proteína de superfície; *gelE*: gelatinase; *ace*: adesina; *as*: substância de agregação; *efaA*: antígeno A; *cylA*: citolisina.

Fonte: Gomes et al. (2008).

Entre os fatores de virulência mais conhecidos em enterococos está a resistência intrínseca (natural) a antibióticos comumente empregados no tratamento de doenças e, mais importante ainda, é a habilidade em adquirir genes que conferem alta resistência a determinados grupos de antimicrobianos (GAMA, 2008).

3.5.3.1 Resistência aos antimicrobianos

O aumento de resistência de microrganismos aos antimicrobianos tem sido considerado um problema global, sendo a resistência múltipla a drogas observada em muitas linhagens de bactérias, incluindo espécies de *Enterococcus*. O desenvolvimento de microrganismos patogênicos resistentes pode decorrer do uso de antimicrobianos no homem, nos animais e no ambiente. Segundo Cerqueira (2003), os animais são comumente expostos aos antimicrobianos por indicação terapêutica e, ainda, para aumentar a eficiência alimentar e o ganho de peso. A microbiota intestinal de animais que têm sido expostos aos agentes antimicrobianos pode servir como um reservatório de bactérias resistentes a estes microrganismos que, por sua vez, podem estar presentes em alimentos de origem animal.

Os enterococos, especialmente, *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans*, são freqüentemente isolados das mastites bovinas. O uso indiscriminado de antibióticos com dosagens inadequadas, principalmente em casos de mastite, favorece o desenvolvimento de cepas patogênicas multirresistentes, cuja ocorrência na glândula mamária vem sendo observada freqüentemente (VIANNI; LÁZARO, 2003).

Jayaro; Oliver (1992) *apud* Vianni; Lázaro (2003), utilizando a técnica de disco difusão, testaram a resistência de estreptococos e enterococos isolados da secreção da glândula mamária de bovinos, com relação aos aminoglicosídeos e macrolídeos, verificando que se tratando de enterococos, 80% das amostras isoladas foram resistentes à estreptomicina, 30% à canamicina e somente 5% foram resistentes à gentamicina e ao cloranfenicol.

O aumento da severidade das infecções causadas por enterococos, que pode estar relacionado ao uso irracional de antimicrobianos, permite a sua sobrevivência e disseminação no ambiente hospitalar. Além disso, as bactérias desse gênero apresentam uma alta capacidade de adquirir e transferir genes de resistência a antibióticos de uso clínico (VANCANNEYT et al., 2002).

A resistência dos enterococos aos antimicrobianos pode ser dividida em dois tipos: intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca a muitos antibióticos (cefalosporinas, lincosamidas, beta lactâmicos e baixo níveis de aminoglicosídeos) sugere que tratamento a infecções poderia ser difícil. A resistência adquirida inclui resistência ao cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina e glicopeptídeos. A codificação genética para todos estes traços de resistência a antibióticos pode ser transferida por intermédio de ferormônios, plasmídeos conjugativos ou *transposons* para enterococos e patógenos mais virulentos como *S. aureus* e *E. faecalis*. Os enterococos resistentes a antibióticos (ARE) podem ser isolados de produtos lácteos como queijo fabricado com leite cru, carne crua e salsicha e que provavelmente podem entrar no intestino humano (ÇITAK; YUCEL; ORHAN, 2004).

De acordo com o estudo realizado por Cariolato; Andrighetto; Lombardi (2008) as cepas de enterococos isoladas de produtos lácteos foram resistentes para tetraciclina (30,8%), seguida de estreptomicina (25,6%), eritromicina (17,9%) e gentamicina (10,5%). Resistência à vancomicina foi encontrada em 96,8% das cepas de *E. faecalis* e 76% dos *E. faecium* isoladas de um tipo de queijo branco da Turquia (ÇITAK; YUCEL; ORHAN, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Características da indústria

A indústria de laticínios avaliada neste estudo localiza-se na região Sul de Minas Gerais. Trata-se de uma indústria de pequeno porte com aproximadamente 20 funcionários que processa de 10 a 12 mil litros de leite diários, provenientes de aproximadamente 300 produtores, distribuídos em 8 microrregiões, situados numa distância de até 100Km.

A indústria está no mercado há 35 anos e os produtos fabricados são: queijo Minas frescal, mussarela e derivados (nozinho e palitinho), prato, Minas padrão, Araxá, coalho e ricota. A fabricação é realizada de acordo com o pedido dos clientes, sendo que os queijos Minas frescal, prato, mussarela e ricota são processados diariamente. A distribuição dos produtos é realizada na cidade de São Paulo e na região de Campinas.

4.2 Coleta das amostras

Durante o período de abril a julho de 2009 foram realizadas três coletas de amostras em diferentes dias na indústria de laticínios. Cada uma das três coletas foi realizada durante o período de produção do dia e o intervalo entre cada uma das coletas foi de aproximadamente um mês. Amostras de leite cru, leite pasteurizado, soro de queijo, ricota antes e após embalagem além de amostras do ambiente de vários locais da linha de processamento de ricota foram coletadas (**Tabela 6**). A amostragem deste trabalho foi estabelecida de acordo com o estudo de Rocha (2004). A descrição do processamento da ricota realizado pela indústria está apresentada no **Apêndice A** (A1 e A2).

A coleta das amostras foi realizada de acordo com a seqüência do processamento de ricota, na seguinte ordem:

1. Coleta das amostras de superfície do ambiente após a sanitização realizada pela indústria;
2. Leite cru coletado no tanque de recepção do leite;

3. Leite pasteurizado coletado no tanque de recepção do leite pasteurizado;
4. Soro de queijo coletado nos tanques de processamento da ricota;
5. Ricota antes da embalagem, após duas horas de exposição à temperatura ambiente na sala de espera;
6. Amostras de ar ambiente da sala de produção (no início, após duas horas e no final do processamento de ricota), sala de espera (no momento em que as ricotas antes da embalagem ficam expostas ao ar ambiente), câmara fria e sala de embalagem;
7. Ricota embalada, após 21 dias de armazenamento a temperatura entre 4 – 7°C.

Tabela 6. Número de amostras coletadas na indústria de laticínios

Amostra	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	Total
Leite cru	1	1	1	3
Leite pasteurizado	1	1	1	3
Soro de queijo	3	3	3	9
Ricota antes de embalagem	5	5	5	15
Ricota depois de embalagem	5	5	5	15
Água	1	1	1	3
Superfícies do ambiente	20	20	20	60
Ar ambiente	6	6	6	18

Leite

Foram analisadas um total de 6 amostras de leite, sendo 3 amostras de leite cru e 3 amostras de leite pasteurizado. Cada amostra foi formada através da mistura de 10 alíquotas de 100mL de leite cru ou pasteurizado, coletadas aleatoriamente durante todo o período de produção do dia, totalizando 1000mL por unidade amostral.

Soro de queijo

Foram analisadas um total de 9 amostras de soro de queijo. A cada batelada de processo foi retirado 1000mL de soro de queijo de diversos pontos do tanque de recepção de soro. Este procedimento foi realizado em três diferentes bateladas, totalizando três unidades amostrais por coleta.

Ricota antes da embalagem

Um total de amostras de 15 ricotas após permanecerem 2 horas expostas à temperatura ambiente foi analisado, sendo que em cada uma das coletas, 5 unidades amostrais foram analisadas.

Ricota embalada

Foram analisadas 15 amostras de ricota embalada e armazenada em geladeira a 4-7°C no laboratório de Higiene do Departamento de Tecnologia de Alimentos, após 21 dias, sendo 5 amostras correspondentes a cada uma das três coletas realizadas.

Em cada uma das coletas, as cinco amostras de ricota antes da embalagem analisadas pertenciam ao mesmo lote e dia de processamento que as cinco amostras de ricota embalada.

Água

No total 3 amostras de água foram analisadas a fim de verificar sua potabilidade de acordo com a portaria nº 518 (2004) do Ministério da Saúde que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.

A água que foi coletada na indústria é utilizada para a retirada da espuma formada no processo de ricota. A saída de água da mangueira foi higienizada com álcool 70%, após, deixou-se a água escoar por 2 minutos. Em seguida foi coletado

1000mL de água em um saco plástico estéril contendo 0,5% de neutralizante tiosulfato de sódio.

Amostras de superfícies do ambiente

Sessenta amostras de superfícies das instalações, equipamentos e utensílios da linha de produção foram coletadas após os procedimentos de limpeza e sanitização da planta, somando 20 amostras em cada uma das 3 coletas, como ilustra a **Figura 2**.

A amostragem foi realizada utilizando-se o método de contato direto de esponja, que consistiu na pressão e arraste de esponja estéril de celulose, embebida em 20 mL de água peptonada 0,1% com 0,5% de neutralizante tiosulfato de sódio, pela superfície alvo, segundo recomendado pela *American Public Health Association* - APHA (2001).

Em três pontos (tanque de recepção do leite, tanque de processamento da ricota e mangueira de transporte do soro) foi utilizada a técnica de “swab” que consistiu na pressão e movimentos da esquerda para a direita e depois de baixo para cima, girando-o continuamente para que toda a superfície do algodão entrasse em contato com a superfície. Os “swabs”, após amostragem foram colocados em 10 mL de água peptonada 0,1% contendo 0,5% de neutralizante tiosulfato de sódio de acordo com o APHA (2001).

Para a análise da vassoura utilizada para a limpeza do tanque de processamento da ricota e da tela utilizada na enformagem da ricota realizou-se a técnica da lavagem superficial, onde foi utilizado 200mL e 100mL de água peptonada 0,1% com 0,5% de neutralizante tiosulfato de sódio, respectivamente.

A área analisada foi padronizada para 100 cm², entretanto, para alguns locais, a área analisada foi específica em função da configuração dos equipamentos e utensílios, sendo de 80 cm² para a bomba de transporte de soro, 180 cm² para o tanque de recepção do leite e 162cm² para a caixa de armazenamento.

Para os utensílios como pote e pá para recolhimento dos grumos, mexedor, forma, tela e tampa-prensa para enformagem da ricota, peneira e vassoura os resultados foram expressos em UFC/unidade. Os locais relativos à coleta de amostras de superfícies ambientais estão discriminados na **Figura 2**.

Ar ambiente

Amostras do ar ambiente foram coletadas nas áreas de produção (início, meio e fim da produção de ricota), sala de espera onde a ricota fica exposta a temperatura ambiente, câmara fria e sala de embalagem, totalizando 6 amostras por coleta.

O método utilizado foi o de sedimentação de acordo com a APHA (EVANCHO et al., 2001), que estabelece 15 minutos de exposição da placa aberta contendo meio seletivo para os microrganismos que foram analisados neste trabalho. Após a amostragem, as placas foram incubadas de acordo com as condições apropriadas a cada microrganismo.

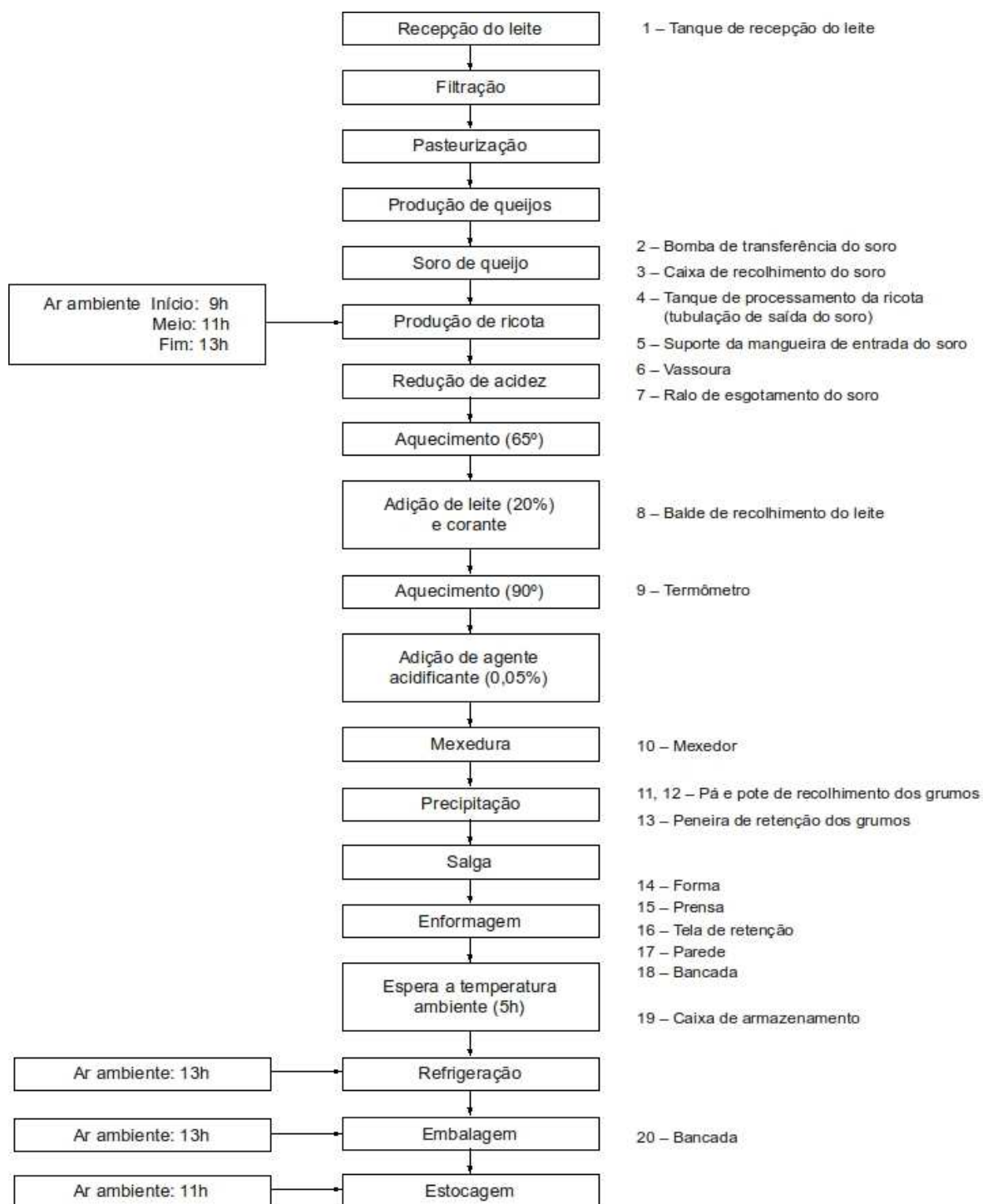


Figura 2. Fluxograma de produção da ricota e pontos de amostragem ambiental.

4.3 Preparo das amostras

Leite cru, leite pasteurizado, soro de queijo e água

Cada unidade analítica de 25mL de amostra foi homogeneizada com 225mL de água peptonada 0,1%, sendo realizadas as diluições decimais subseqüentes na mesma solução.

Ricota antes e após embalagem

De acordo com o *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (DUNCAN; YAUN; SUMNER, 2004), todo o conteúdo da unidade de amostra de ricota antes e após a embalagem foi macerado com uma espátula estéril, retirada uma porção de 25g e adicionada em 225mL de água peptonada a 0,1%. Depois de homogeneizada em *stomacher*, foram preparadas diluições decimais seriadas com este mesmo diluente.

Amostras ambientais

As esponjas em solução de água peptonada 0,1% com neutralizante tiosulfato de sódio 0,5% foram homogeneizadas no *stomacher* durante 2 minutos. Após, alíquotas de 1mL foram transferidas para a solução de água peptonada 0,1% para a realização das diluições decimais subseqüentes.

Os “swabs” foram retirados da solução de água peptonada 0,1% com 0,5% de neutralizante tiosulfato de sódio e a mesma foi homogeneizada no vortex durante 1 minuto. Após, alíquotas de 1mL foram transferidas para a solução de água peptonada 0,1% para a realização das diluições decimais subseqüentes.

4.4 Determinação de *Bacillus cereus*

A determinação deste microrganismo foi realizada utilizando-se o método recomendado pela APHA (BENNETT; BELAY, 2001). Alíquotas de 0,1mL de cada diluição decimal (10^{-1} a 10^{-4} para amostras de matéria-prima e água e 10^0 a 10^{-4} para as amostras ambientais) foram semeadas em superfície de ágar *Mannitol* -

Yolk - Polymyxin - MYP (Difco). As placas foram incubadas a 30°C /24h, as colônias características de *B. cereus* contadas e o resultado expresso em UFC/mL ou UFC/g ou UFC/cm².

Após contagem das UFC típicas, cinco colônias foram estriadas em ágar triptona soja (Merck) - TSA e incubadas a 30 °C por 24h, para confirmação e identificação segundo a APHA (BENNETT; BELAY, 2001), através da coloração de Gram, reação de catalase, fermentação anaeróbia da glicose, decomposição da tirosina, teste de motilidade, crescimento rizóide, atividade hemolítica e detecção de cristais de toxinas, esta última realizada segundo metodologia descrita por SHARIF e ALAEDDINOGLU (1998).

Para a avaliação do ar ambiente, as placas de ágar MYP (Difco) foram incubadas a 30°C/24h. As colônias características de *B. cereus* foram contadas e o resultado expresso em UFC/placa. A confirmação e identificação da espécie foram realizadas através das provas bioquímicas citadas acima.

4.5 Determinação de *Enterococcus* spp.

A determinação desse microrganismo foi realizada utilizando-se o método recomendado pela APHA (HARTMAN; DEIBEL; SIEVERDING, 2001). Alíquotas de 1mL de cada diluição decimal (10^{-1} a 10^{-5} para amostras de matéria-prima e água e 10^0 a 10^{-5} para as amostras ambientais) foram inoculadas em profundidade no ágar Kenner Fecal *Streptococcus* – KF (Difco) suplementadas com 1% de cloreto 2,3,5 - trifenil tetrazólio - TTC e incubadas a 45 °C por 48h a fim de suprimir o crescimento de uma possível microbiota acompanhante (lactobacilos e outros estreptococos lácticos). Após a incubação as colônias características de *Enterococcus* spp. (vermelhas ou rosas) foram contadas e o resultado expresso em UFC/mL ou UFC/g ou UFC/cm².

Cinco colônias típicas foram transferidas para o ágar infusão cérebro coração – BHI (Difco) e incubadas a 35°C por 18 a 24h. Após, foi preparado um esfregaço de coloração de Gram para a observação da morfologia típica de enterococos (cocos Gram-positivos, alongados, aos pares e ocasionalmente em cadeias

curtas). Também foi realizado o teste da atividade de catalase. Os enterococos são catalase negativa (HARTMAN; DEIBEL; SIEVERDING, 2001).

Foi verificada a capacidade de multiplicação em caldo BHI (Himedia) contendo 6,5% de cloreto de sódio e caldo BHI a pH 9,6; multiplicação a 10 °C e a 45 °C e crescimento em ágar Bile esculina (Oxoid) de acordo com a metodologia recomendada pela APHA (HARTMAN; DEIBEL; SIEVERDING, 2001).

Para a avaliação do ar ambiente, as placas de ágar KF (Difco) foram incubadas a 45°C/48h. As colônias características de *Enterococcus* spp. foram contadas e o resultado expresso em UFC/placa. A confirmação do gênero foi realizada através das provas bioquímicas citadas acima.

4.5.1 Identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através de Reação de Polimerização em Cadeia – PCR

Os isolados de *Enterococcus* spp. foram ativados por estrias em ágar BHI (Difco) e incubados a 35 °C por 24 horas. Uma colônia foi então inoculada em 4ml de caldo BHI (Himedia) e incubada a 35 °C por 24 h. Seiscentos µl desta cultura foram então centrifugados a 13.0 rpm por 10min. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 95 µl de 1x tampão PCR, tratadas com 4 µl de lisozima ([50mg/ml]) a temperatura ambiente por 15 min e com 1µl de proteinase K ([20mg/ml]) a 60°C por 60 min, seguida de fervura por 5 min. Após a lise celular, procedeu-se à técnica de PCR (FURRER et al., 1991).

A identificação das espécies de *E. faecium* e *E. faecalis* foi realizada pela técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR), para o gene *ddl* segundo Gomes (2007). Os *primers* utilizados são os descritos por Dutka-Malen; Evers; Courvalin (1995), conforme a **Tabela 7**.

Tabela 7. Descrição dos *primers* utilizados na identificação de *E. faecalis* e *E. faecium*

Espécie	Gene amplificado	Seqüência dos <i>primers</i> (5' – 3')	Produto (pb)
<i>E. faecalis</i>	<i>ddl</i> _{<i>E.faecalis</i>}	+ATCAAGTACAGTTAGTCT	941
		-ACGATTCAAAGCTAACTG	
<i>E. faecium</i>	<i>ddl</i> _{<i>E.faecium</i>}	+GCAAGGCTTCTTAGAGA	550
		-CATCGTGTAAGCTAACTTC	

Fonte: Dutka-Malen; Evers; Courvalin (1995).

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador Mastercycler epgradient S (Eppendorf) utilizando-se um ciclo inicial a 94°C/2min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 54 °C por 1min e extensão a 72°C por 1min e ciclo final a 72°C/10min. Para cada reação de amplificação foi preparado um volume total de 25µl contendo 0,2µl da enzima Taq-polimerase (15/ul); 2,5µl de tampão 10 X (200mM Tris-HCl- pH 8,0; 500 mM de KCl); 1,0µl de MgCl₂ 50 mM; 0,5µl de dNTP's 10 mM; 2µl [12,5 mM] de cada um dos *primers*, 1µl do DNA extraído e água Mili-Q esterelizada. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, utilizando-se o corante *Syber Safe* por 30 minutos para visualização do produto da PCR pela transiluminação UV. Marcadores de peso molecular foram incluídos em cada gel.

4.5.2 Avaliação do potencial de patogenicidade das culturas de *Enterococcus* spp.

4.5.2.1 Atividade de hemolisinas

As culturas de *Enterococcus* spp. foram inoculadas, em forma de estrias, na superfície de ágar BHI (Difco) suplementado com 5% de hemácias de cavalo desfibrinadas e incubada a 37°C/48h. A formação de halos de hemólise ao redor das colônias era indicativa de reação positiva. Como controle positivo foi utilizado *S. aureus* ATCC 23235 (NASCIMENTO, 2007).

4.5.2.2 Produção de gelatinase

As culturas de *Enterococcus* spp. foram inoculadas em ágar gelatina nutriente (Oxoid) e incubadas a 35°C/5 dias. A liquidação do meio era indicativa de reação positiva para gelatinase. Foi utilizado *B. cereus* HAG-7 como controle positivo (ANDRADE, 2009).

4.5.2.3 Atividade de termonucleases

Em placas de petri contendo ágar Bacto-DNAse Test (Difco) suplementado com 0,83% de azul de toluidina 1% foram feitos doze orifícios de 5mm, onde foram inoculados 50µl das culturas de *Enterococcus* spp. ativa em caldo BHI, previamente submetida a 100°C/15min em banho-maria. A presença de zonas de coloração rosa ao redor dos poços, após incubação a 37°C/24h, era indicativa de resultado positivo. Como controle positivo foi utilizado *S. aureus* ATCC 23235 (NASCIMENTO, 2007).

4.5.3 Avaliação da resistência de *E. faecium* e *E. faecalis* aos antibióticos

A sensibilidade a antimicrobianos dos isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* foi testada pelo método de disco-difusão em ágar, conforme metodologia preconizada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2005).

Após a incubação em caldo BHI (Himedia) a 35°C/24h, as culturas foram ativadas em um novo caldo BHI (Himedia) a 35°C por mais 4 a 6 horas e com o auxílio do aparelho Densimat (*Biomerieux*), a turbidez de cada suspensão de cultura foi ajustada em solução salina estéril 0,85%, de modo a obter uma turbidez óptica equivalente a escala de 0,5 de McFarland.

As suspensões ajustadas foram inoculadas em placas de ágar Mueller - Hinton (Difco) através de um “swab” de algodão estéril. Os discos de antimicrobianos foram então colocados na superfície das placas semeadas, distribuídos por igual. As placas foram incubadas a 35°C por 24h. O diâmetro do halo de inibição ao redor de cada disco foi mensurado com uma régua em mm. A

interpretação dos resultados foi realizada conforme os critérios apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Padrão de interpretação dos diâmetros dos halos de identificação de inibição do crescimento de *E. faecium* e *E. faecalis*

Antimicrobiano	Concentração do disco (µg)	Diâmetro da zona (mm)		
		R	I	S
Tetraciclina	30	≤14	15-18	≥19
Eritromicina	15	≤13	14-22	≥23
Cloranfenicol	30	≤12	13-17	≥18
Gentamicina	120	6	7-9	≥10
Vancomicina	30	≤14	15-16	≥17

R: Resistente; I: Intermediário; S: Sensível
Fonte: NCCLS (2005).

4.6 Avaliação microbiológica da ricota conforme a RDC ANVISA nº 12/2001

Antes de abrir as embalagens, a área externa foi desinfetada com álcool 70%, para remover os contaminantes presentes. A embalagem foi cortada com uma tesoura estéril. Qualquer anormalidade na embalagem ou no conteúdo interno como vazamento, odor e/ou aparência estranha, presença de corpos estranhos, estufamento, etc, foi avaliada e anotada.

De acordo com o *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (DUNCAN; YAUN; SUMNER, 2004), todo o conteúdo da unidade de amostra do queijo ricota foi macerado com uma espátula estéril, retirada uma porção de 25g e adicionada em 225mL de água peptonada a 0,1%. Depois de homogeneizada, foram preparadas diluições decimais seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) para contagem de estafilococos coagulase positiva, coliformes termotolerantes, assim como *Bacillus cereus* e *Enterococcus* spp. já mencionados.

4.6.1 Determinação de coliformes a 45°C

A contagem foi realizada utilizando-se a técnica do Número Mais Provável - NMP – de três tubos, segundo recomendação da *American Public Health Association* – APHA (KORNACKI; JOHNSON, 2001), inoculando-se as diluições

da amostra em caldo Lauril Sulfato Triptose - LST (Oxoid). As culturas dos tubos com resultados presuntivos positivo (produção de gás) após 24 e 48h de incubação a 35 °C foram transferidas para o caldo *Escherichia coli* - EC (Merck) e incubados em banho-maria a 45 °C para a confirmação da presença de coliformes termotolerantes.

4.6.2 Determinação de estafilococos coagulase positiva

A determinação foi realizada utilizando-se o método recomendado pela APHA (BENNET; LANCETTE, 2001). As diluições das amostras foram semeadas na superfície do ágar Baird Parker – BP (Difco) suplementado com solução aquosa de telurito de potássio 1% e emulsão gema de ovo:salina (1:1) e as placas foram incubadas a 35 °C por 48h. Procedeu-se uma contagem presuntiva das Unidades Formadoras de Colônias.

Cinco colônias suspeitas foram selecionadas e transferidas para ágar BHI, seguido de incubação a 35 °C por 24h para confirmação, através da caracterização morfológica por coloração de Gram e dos testes bioquímicos de catalase e coagulase.

4.6.3 Detecção de *Salmonella* spp

A determinação de *Salmonella* sp. foi realizada segundo recomendação da APHA (ANDREWS et al., 2001). Cada unidade de 25g de amostra foi homogeneizada com 225mL de água peptonada tamponada (Difco) durante 2 minutos. Após incubação por 24h a 35 °C, 0,1 mL do caldo foi transferido para 10mL de caldo Rappaport-Vassiliardis (Oxoid) - RV, incubado a 42 °C e 1,0 mL transferido para 10 mL de Caldo Tetratonato (Oxoid) - TT, incubado a 43 °C, ambos em banho-maria. Uma alçada destes caldos foi estriada em ágar Xylose Lysine Desoxycholate (Merck) - XLD, ágar Bismuto Sulfito (Difco) - BS e ágar Hektoen Enteric (Oxoid) - HE e incubados a 35 °C por 24h.

De duas a cinco colônias típicas de cada placa de ágar HE (colônias verde azuladas, com ou sem centro negro), de BS (colônias pretas, cinzas e marrons) e

de XLD (colônias róseo escuro, com ou sem centro preto), foram transferidas para tubos contendo ágar Triple Sugar Iron – TSI (Difco) e Lysine Iron ágar – LIA (Difco), os quais foram incubados a 35 °C/24h.

Os isolados, com reações características de *Salmonella* no TSI e LIA, foram submetidos ao teste de aglutinação com antisoro *Salmonella* polivalente somático.

4.6.4 Detecção de *Listeria monocytogenes*

As análises foram realizadas segundo o método recomendado pelo *Canadian Health Product and Food Branch* (PAGOTTO et al., 2001). Cada unidade de 25 g de amostra foi homogeneizada com 225 mL de caldo *Listeria* Enrichment Broth base - LEB (Oxoid) em *stomacher* e incubada a 30 °C. Após 24h e 48h de incubação, 0,1 mL do caldo LEB (Oxoid) foi inoculado em 10 mL de caldo Fraser Modificado - MFB (Difco), sendo incubado a 35 °C/48h. Os tubos positivos de MFB (coloração escura) de 24 e 48h, assim como os tubos negativos (sem escurecimento), foram semeados por estrias em ágar Oxford Modificado – MOX (Difco) e ágar Oxford – OXA (Difco), sendo as placas incubadas a 35 °C por 48h.

Cinco colônias típicas de cada placa de ágar MOX e de ágar OXA (colônias pretas com halo escuro) foram purificadas e mantidas em ágar BHI (Difco) até sua identificação.

A identificação foi realizada através de caracterização morfológica (coloração de Gram), e bioquímica pelos testes de produção de catalase, β hemólise em ágar TSA (Merck) suplementada com 5% de sangue de cavalo, motilidade a 25 °C em meio SIM (Biobrás) e produção de ácido a partir da utilização da ramnose, manitol e xilose.

4.7 Análise de potabilidade da água

O procedimento foi realizado de acordo com a metodologia da *American Public Health of Water and Wastewater* (1985), recomendado para a análise de água destinada ao consumo humano, para verificação da conformidade com padrões legais de potabilidade.

4.7.1 Determinação de coliformes a 45°C

A amostra foi homogeneizada e logo após transferido 10mL da mesma para 10 tubos contendo em cada um 10mL de caldo LST (Oxoid) em concentração dupla. Os tubos foram incubados a 35°C/24 horas. Nos tubos com reação positiva (crescimento e produção de gás) foi transferida uma alçada do meio para o Caldo Bile Verde Brilhante - VB (Oxoid) para teste confirmativo do grupo coliformes totais e incubados a 35°C por 24 a 48h. Em caso negativo, os tubos de LST (Oxoid) foram reincubados até completar 48 horas. Neste caso, os tubos que positivaram seguiram as mesmas determinações que os de 24 horas.

Nos tubos positivos para o caldo VB (Oxoid) foi transferida uma alçada do meio para o caldo EC (Merck) para a detecção de coliformes termotolerantes e incubados em banho maria a 45°C/24horas. Os resultados foram analisados em tabela do Número Mais Provável (NMP).

4.7.2 Contagem total de aeróbios mesófilos

Unidades analíticas de 25mL das amostras de água foram homogeneizadas em 225mL de água peptonada 0,1%, sendo realizadas as diluições decimais subsequentes (10^0 a 10^{-5}) na mesma solução e inoculadas em superfície no ágar Padrão para Contagem – PCA (Oxoid) e incubadas a 35 °C/48h.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Avaliação de *Bacillus cereus* no processamento de ricota

Um total de cem (100) isolados com características de *Bacillus* spp. de amostras de matérias-primas, amostras ambientais, ar ambiente e produto final foram submetidos as análises bioquímicas de catalase, coloração de Gram, fermentação anaeróbia da glicose, decomposição da tirosina, teste de motilidade, crescimento rizóide, atividade hemolítica e detecção de cristais de toxinas. Destes, 48 foram identificados como *B. cereus*.

Os resultados das análises bioquímicas para confirmação de gênero *Bacillus* e identificação da espécie *B. cereus* dos isolados das amostras, estão apresentados nas **Tabelas B1, B2 e B3** do **Apêndice B**.

5.1.1 Matéria-Prima

Analisando a **Tabela 9**, verifica-se que o *Bacillus cereus* esteve presente nas matérias-primas utilizadas para o processamento da ricota, no entanto, houve variabilidade de contaminação entre as três coletas. Na primeira coleta, o leite pasteurizado atingiu contagem de $1,2 \times 10^3$ UFC/mL e o soro de queijo de até $1,0 \times 10^3$ UFC/mL. Na segunda coleta, as matérias prima mantiveram contagens menores que 10^2 UFC/mL. O leite cru apresentou contagem de $1,4 \times 10^4$ UFC/mL na terceira coleta.

Tabela 9. Contagem de *Bacillus cereus* (UFC/ml) na matéria prima utilizada para a fabricação de ricota

Amostra*	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
LC	$< 10^2$	$< 10^2$	$1,4 \times 10^4$
LP	$1,2 \times 10^3$	$< 10^2$	$< 10^2$
S1	$2,7 \times 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
S2	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
S3	$1,0 \times 10^3$	$< 10^2$	$< 10^2$

* LC: Leite Cru; LP: Leite Pasteurizado; S: Soro de queijo.

Embora não exista uma legislação específica em relação à enumeração de *B. cereus* presente no leite, a legislação para o leite UAT estabelece que esse produto não deve apresentar microrganismos patogênicos e causadores de alterações físicas, químicas e organolépticas após permanecer por sete dias incubado a uma temperatura de 25-37°C (BRASIL, 1996).

Rocha (2004) rastreando *Bacillus cereus* em uma indústria processadora de queijo Minas frescal obteve contagens de até $7,0 \times 10^5$ UFC/mL em leite cru e $2,5 \times 10^4$ UFC/ml em leite pasteurizado.

Griffiths (1992) em seu estudo constatou que das 150 amostras de leites cru e pasteurizado analisadas, 105 (70%) apresentaram uma microbiota representativa do gênero *Bacillus*, sendo *B. cereus* detectado em 37,3% das amostras de leite cru e 36,5% das amostras de leite pasteurizado. Odumero et al. (1997) analisaram 43 amostras de leite pasteurizado e constataram a presença deste microrganismo em todas as amostras analisadas.

Lin et al. (1998) em pesquisa com 232 amostras de leite, constataram baixa ocorrência do microrganismo em leite cru (menos de 50 UFC/mL); porém, o leite pasteurizado apresentou elevada concentração de *B. cereus*, com valores acima de 10^5 UFC/mL. Os autores afirmam que a presença de *B. cereus* no ambiente indica uma fonte potencial de contaminação do leite e ainda, que a contaminação do ambiente da usina pode ser oriunda do leite contaminado. De fato, ambas as afirmações não se contradizem tendo em vista o círculo vicioso que se forma levando à persistência do microrganismo no laticínio.

Notermans; Batt (1998) reportaram em seu estudo a ocorrência de 10^4 a 10^5 UFC de *B. cereus*/mL de leite pasteurizado em 5% das amostras analisadas.

Rezende-Lago, et al. (2007) verificaram a ocorrência de *B. cereus* em leite integral e constataram que 50,0% das amostras de leite cru apresentaram-se contaminadas por *B. cereus*, sendo que, após a pasteurização, 96,7% amostras de leite pasteurizado apresentaram a contaminação pelo microrganismo, reforçando a teoria da contaminação após o tratamento térmico do leite, como

defendem outros autores, já que o biofilme formado nas tubulações percorridas pelo leite pasteurizado facilitaria essa contaminação pós-processamento térmico.

O *B. cereus*, por ser um microrganismo termodúrico e produzir biofilmes em tubulações de leite pode favorecer a contaminação do leite após o processamento térmico, fato que pode estar diretamente relacionado com os resultados encontrados no nosso estudo onde verificou que o leite pasteurizado apresentou maior contaminação deste microrganismo no leite pasteurizado do que no leite cru. Assim, a higienização incorreta do trocador de calor a placas, poderia levar à formação de biofilmes que, por sua vez, promoveria a contaminação do leite pasteurizado.

De acordo com Giffel et al. (1997) os esporos de *B. cereus* podem aderir ao aço inoxidável, germinar e/ou multiplicar-se nos tubos de um trocador de calor, uma vez que em seu estudo verificaram que este microrganismo pôde ser isolado nos tubos de um trocador de calor antes e depois da pasteurização do leite, sendo a sua identidade verificada através da reação de cadeia da polimerase (RAPD) para confirmar que os microrganismos encontrados nas superfícies eram os mesmos que os encontrados no leite.

Ademais, Dufrenne et al. (1994) afirmam que a pasteurização não é suficiente para eliminação de *B. cereus* cujos esporos são termorresistentes além de algumas cepas deste patógeno serem produtoras de enterotoxinas.

Portanto, embora não tenham sido encontrados trabalhos estudando a presença de *B. cereus* em soro de queijo, pode-se dizer que esta matéria prima é uma potencial fonte de contaminação para o produto final, uma vez que no nosso trabalho o soro de queijo apresentou contagens de até 10^3 UFC/mL e é a principal matéria prima para a fabricação da ricota.

5.1.2 Amostras ambientais

Dentre as 60 amostras de ambiente, superfície de equipamentos e utensílios coletadas, houve uma grande variação no grau de contaminação dos locais de amostragem. As análises revelaram desde locais com populações

menores que 1UFC/cm² ou UFC/unidade até 10⁷UFC/unidade (**Tabela 10**). O ralo no qual é escoado o excesso do soro de queijo apresentou contaminação por *B. cereus* chegando a contagem de 4,0 x10³UFC/unidade na segunda coleta.

Tabela 10. Contagem (UFC/cm² ou unidade) de *B. cereus* em superfícies de ambientes, equipamentos e utensílios em indústria processadora de ricota

Amostras	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Tanque de recepção do leite	< 1	< 1	< 1
Suporte da mangueira de entrada do soro	< 1	< 1	< 1
Tanque 2*	< 1	< 1	< 1
Bomba de transferência do soro	< 1	< 1	< 1
Caixa de recolhimento do soro	< 1	< 1	< 1
Parede	< 1	< 1	< 1
Bancada 1**	< 1	< 1	< 1
Bancada 2***	4,0 x10 ¹	< 1	< 1
Caixa de armazenamento	4,8 x10 ¹	< 1	< 1
Forma ^u	1,7x10 ⁷	2,0 x10 ³	3,7 x10 ⁶
Prensa ^u	< 1	< 1	< 1
Tela de retenção ^u	< 1	< 1	< 1
Peneira ^u	< 1	< 1	< 1
Mexedor ^u	< 1	< 1	< 1
Pá ^u	< 1	< 1	< 1
Pote ^u	< 1	< 1	< 1
Balde de recolhimento do leite ^u	< 1	< 1	< 1
Termômetro ^u	< 1	< 1	< 1
Vassoura ^u	< 1	< 1	< 1
Ralo de esgotamento do soro ^u	2,6 x10 ²	4,0 x10 ³	< 1

* Tanque de processamento da ricota (tubulação de saída do soro)

** Bancada da área de enformagem

*** Bancada da área de embalagem

^u: em UFC/unidade.

A forma de ricota apresentou contaminação persistente durante as coletas chegando a 1,7 x10⁷UFC/unidade na primeira coleta. Os valores encontrados são bastante preocupantes, uma vez que a ricota fica em contato direto com a forma após o tratamento térmico durante aproximadamente 24 horas. Além disso, não há nenhum tratamento posterior capaz de eliminar a carga microbiana do produto,

uma vez que a ricota após este período é desenformada, embalada e armazenada. A partir destes resultados, pode-se presumir que as condições insatisfatórias de sanitização ocorrentes, podem ter levado a valor tão elevado de contaminação.

A contagem de *B. cereus* na caixa de armazenamento chegou a $4,8 \times 10^1$ UFC/cm² na primeira coleta. Estas caixas servem para armazenar as ricotas enformadas durante as 5 horas em que ficam expostas a temperatura ambiente.

Na bancada 2, a qual é utilizada para embalar o produto final, obteve-se contagem de *B. cereus* de $4,0 \times 10^1$ UFC/cm² na primeira coleta.

A contaminação cruzada através de superfícies que contatam alimentos é freqüentemente relatada como um dos fatores responsáveis pela ocorrência de enfermidade de origem alimentar e locais como as bancadas poderiam constituir abrigos para células vegetativas ou esporos de *B. cereus*.

Na investigação das causas de um surto ocorrido na Itália, envolvendo 173 pessoas, Mendes et al. (2004) identificaram *B. cereus* como o agente etiológico e as bancadas de trabalho como fonte de contaminação dos alimentos envolvidos.

Considerando-se o tempo de geração de aproximadamente 30 minutos, para algumas cepas de *B. cereus*, e a amplitude da temperatura de crescimento (15°C a 45°C), uma população inicial de 1 UFC/g, após 8 horas, poderia gerar uma população de 10^5 UFC/g, suficiente para causar toxinfecção alimentar (MENDES et al., 2004). Assim, conclui-se que a simples detecção do microrganismo no ambiente de uma indústria alimentícia é suficiente para sugerir a adoção de medidas para o seu controle.

As amostras de outras superfícies como peneira, mexedor, pá, pote e termômetro apresentaram em todas as coletas contagens inferiores a 1 UFC/unidade. Estes resultados podem estar relacionados a longa permanência destes utensílios em solução clorada a 2mg/L.

Rocha (2004) avaliou 120 amostras ambientais em indústria de laticínios e detectou a presença de *B. cereus* em diversos locais, dentre eles a bomba de transporte de soro, utilizada no processo de fabricação da ricota. O autor enfatizou

que uma bomba de múltiplo uso mal higienizada poderia tornar-se fonte crônica de contaminação cruzada de instalações e equipamentos quando da sua utilização para o transporte de soro de leite e no enxágüe final pós sanitização.

Peng; Tsai; Chou (2001) demonstraram a capacidade de adesão dos esporos e células vegetativas de *B. cereus* à superfície do aço inoxidável que é comumente utilizado na indústria de laticínios, podendo levar à formação de biofilmes que resultaria em maior resistência dos microrganismos ao calor e a processos de sanitização. Os autores relataram ainda o aumento da taxa de adesão do *B. cereus* a estas superfícies em presença de componentes do leite.

O ar ambiente coletado nas áreas de processamento de ricota, na sala de espera onde a ricota fica exposta a temperatura ambiente, na câmara fria e na sala de embalagem não apresentou contagem de *B. cereus* (< 1UFC/placa).

Soares (2004) observou a presença de *B. cereus* no ar ambiente em 84,4% do total de amostras de ar coletadas em dois restaurantes institucionais. No primeiro restaurante, as áreas com maiores pontos de contaminação por *B. cereus* foram às áreas de cocção, distribuição e *self-service* enquanto que no segundo restaurante foi à área de recepção de gêneros, evidenciando, deste modo, a importância do ar ambiente como fonte de *B. cereus* em estabelecimentos processadores de alimentos.

5.1.3 Produto final

Embora *Bacillus cereus* não esteja relacionado como parâmetro microbiológico pela RDC 12/2001 da ANVISA para queijos de alta umidade, para o setor de laticínios merece destaque em pesquisas, dada a sua característica de resistência à pasteurização e propriedades deteriorantes sobre o leite. Portanto, neste trabalho, utilizou-se como referência para os dados obtidos, o limite máximo estabelecido pela legislação para o leite em pó que é de 10^3 UFC/g.

De acordo com esta referência, pode-se verificar, no presente estudo que das 15 amostras de ricota antes de serem embaladas analisadas, 5 (33,34%)

apresentaram contagens de *B. cereus*, acima de 10^3 UFC/g, atingindo valor de $1,0 \times 10^4$ UFC/g na terceira coleta, como mostra a **Tabela 11**.

Tabela 11. Contagem de *B. cereus* (UFC/g) na ricota antes de ser embalada após 2h de enformagem

Unidade amostral*	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
RA1	$< 10^2$	$< 10^2$	$1,0 \times 10^4$
RA2	$6,0 \times 10^3$	$< 10^2$	$9,6 \times 10^3$
RA3	$7,2 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$< 10^2$
RA4	$5,0 \times 10^3$	$< 10^2$	$< 10^2$
RA5	$< 10^2$	$< 10^2$	$6,8 \times 10^3$

* RA: Ricota antes de embalada.

O grau de contaminação de *B. cereus* nas unidades amostrais de ricota embaladas e armazenadas a 4-7°C por 21 dias, referentes a 2ª e a 3ª coletas não apresentou variação entre si, sendo os valores inferiores a 10^2 UFC/g. Das 15 amostras analisadas, apenas uma (6,7%), referente à primeira coleta, apresentou contagem ($7,0 \times 10^3$ UFC/g) acima do valor de referência, conforme ilustra a **Tabela 12**.

Tabela 12. Contagem de *B. cereus* (UFC/g) em amostras de ricota armazenadas por 21 dias a 4-7°C

Unidade Amostral*	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
RF1	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
RF2	$7,0 \times 10^3$	$< 10^2$	$< 10^2$
RF3	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
RF4	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
RF5	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$

* RF: Ricota embalada.

Na primeira coleta, verificou-se que uma das amostras do produto final atingiu contagens elevadas de *B. cereus*. Este resultado pode estar associado à presença de esporos provenientes da matéria-prima (leite cru) que uma vez resistindo ao tratamento térmico na pasteurização tiveram condições de desenvolvimento no soro do queijo e nas etapas seguintes até a ricota final.

(**Tabelas 9, 11 e 12**). Além disso, não se pode descartar a possível contaminação cruzada, uma vez que na bancada de embalagem da ricota, na forma da ricota, na caixa de armazenamento e no ralo do soro foi constatada (**Tabela 10**) a presença deste microrganismo em quantidades superior a 10^1 UFC/unidade.

Entretanto, nosso estudo revelou um maior número de amostras de ricota com contagens de *B. cereus* superiores a 10^3 UFC/g antes da embalagem (5) do que após a embalagem (1).

As ricotas antes de serem embaladas ficam expostas a temperatura ambiente por um período de 5 horas para que ocorra o seu pré-resfriamento e em seguida são armazenadas em uma câmara fria a 7°C, sendo embaladas somente no dia seguinte.

Estes resultados sugerem que as células vegetativas de *B. cereus* provenientes das matérias-primas devem ter sido eliminadas no tratamento térmico. Entretanto, os esporos de *B. cereus*, que são termorresistentes, devem ter permanecido após o tratamento térmico. Uma vez que as amostras de ricota antes de embaladas foram coletadas após duas horas de sua fabricação e durante este período mantinham-se a temperatura ambiente, esta condição provavelmente possibilitou a germinação dos esporos e a multiplicação das células vegetativas.

As condições que favorecem o desenvolvimento de *B. cereus* nos em produtos lácteos, incluem algum tratamento que ative os esporos, por temperatura, pH, atividade de água e/ou outros fatores, induzindo a germinação e posterior desenvolvimento, que ocorrerá se houver um resfriamento inadequado e/ou lento, bem como, estocagem de grandes volumes entre 10 e 50°C. Assim, para evitar a germinação de *B. cereus* é importante manter o produto em condições de temperatura abaixo de 10°C, em combinação com pH e atividade de água (ICMSF, 1996).

Watanuki (2008), avaliando a germinação dos esporos de *B. cereus* em leite pasteurizado tipo C a temperatura ambiente e sob refrigeração após o processo de fervura, constatou que após uma hora à temperatura ambiente a contagem média era de 10UFC/mL, após 6 horas estava na faixa entre 10^2 e

10^4 UFC/ml e após 12 horas entre 10^5 e 10^6 UFC/ml. Estes dados revelaram que as amostras mantidas a temperatura ambiente após a fervura tiveram contagens bacterianas superiores à contagem inicial, inclusive atingindo níveis capazes de desencadear uma toxinfecção alimentar, demonstrando a ocorrência da germinação dos esporos e a multiplicação das células vegetativas.

Algumas hipóteses podem ser sugeridas com relação ao fato das amostras de ricota depois de embaladas terem apresentado contagens de *B. cereus* inferiores às amostras de ricota antes de embaladas, como a temperatura de estocagem (7°C) que afeta não só a multiplicação bacteriana como também a competição da microbiota presente.

Além do mais, nosso estudo mostrou a presença de *E. faecium* e *E. faecalis* em todas as amostras de ricota depois de embaladas o que pode ter contribuído para as baixas concentrações de *B. cereus* nestas amostras, uma vez que algumas linhagens de *Enterococcus* de origem alimentar produzem enterocinas que exercem atividade antilisterial além de inibir outros patógenos/toxigênicos como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus* (GIRAFFA, 2002; HAJIKHANI; BEYATLY; ASLIM, 2007; GOMES et al., 2008).

Hajikhani; Beyatly; Aslim (2007) verificaram que 3 das 6 cepas de *E. faecium* isoladas de queijo branco obtidos de diferentes regiões da Turquia possuíam atividade antimicrobiana contra *B. cereus*.

A presença de *B. cereus*, em quantidades de 10^2 UFC/mL não constitui grandes problemas de saúde pública já que a ingestão desta população microbiana possivelmente não causará alguma enfermidade no consumidor. No entanto, a prevenção do problema requer o controle da população inicial na matéria-prima, das condições higiênico-sanitárias do processamento, da possibilidade de germinação dos esporos, bem como, da prevenção do crescimento das células vegetativas nos alimentos cozidos/aquecidos e prontos para o consumo e, finalmente, das condições de estocagem (SANCHEZ, 2005).

5.2 Avaliação de *Enterococcus* spp. no processamento de ricota

5.2.1 Matéria-Prima

Analisando a **Tabela 13**, pode-se verificar que *Enterococcus* spp. estão presentes na matéria-prima utilizada para a fabricação da ricota. Duas amostras de soro de queijo, referentes a terceira coleta, apresentaram contagem deste microrganismo entre 6,0 e 8,3 x10³ UFC/mL.

Tabela 13. Contagem de *Enterococcus* spp. (UFC/ml) na matéria prima utilizada para a fabricação de ricota

Amostra	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
LC	5x10⁵	3,6 x10⁴	1,9 x10⁶
LP	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²
S1	< 10 ²	< 10 ²	6,0 x10³
S2	< 10 ²	< 10 ²	8,6 x10³
S3	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²

LC: Leite Cru; LP: Leite Pasteurizado; S: Soro de queijo.

Altos índices de *Enterococcus* spp. foram revelados no leite cru, chegando a contagens de 1,9 x10⁶ UFC/mL na terceira coleta. De acordo com Mannu et al. (2003) a ocorrência de *Enterococcus* spp. em leite cru e em queijos produzidos com ele é indicativa de contaminação fecal e práticas higiênicas inadequadas durante a ordenha.

Todavia, a contagem deste microrganismo no leite pasteurizado foi menor que 10² UFC/mL, indicando, que a pasteurização, neste caso, foi capaz de reduzir significativamente a contagem de *Enterococcus* spp. do leite cru.

Estes dados estão de acordo com os obtidos no estudo de Temelli et al. (2006) que avaliando as fontes de contaminação microbiológica durante o processamento de queijo branco obtiveram contagens de 10⁶UFC/ml no leite cru e menores que 10² UFC/ml em leite pasteurizado, e relacionaram estes resultados ao processo de aquecimento de 74°C durante 2 minutos, capazes de reduzir significativamente a contagem de *Enterococcus* spp. no leite pasteurizado.

No entanto, os resultados de nossa pesquisa mostraram que embora o tratamento térmico tenha contribuído para a diminuição da contagem de enterococos no leite pasteurizado, não foi capaz de eliminá-los. Vários estudos têm demonstrado a resistência deste microrganismo frente aos processos de pasteurização (FRANZ; HOLZAPFEL; STILES, 1999; FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006). Giraffa (2002) em seu trabalho de revisão relatou que *Enterococcus faecium* é capaz de resistir ao tratamento térmico a 68°C por 30 minutos, enquanto que Perri (2010) obteve *Enterococcus* spp. resistentes no leite pasteurizado a 72°C/15s.

De acordo com Giraffa (2002) no processamento de queijos macios de origem italiana, a pasteurização eficiente do leite cru de qualidade e a incubação a 42-44°C por 12-15h promove uma seleção natural de bactérias ácido lácticas termofílicas e resistentes ao calor, que geralmente são o *Streptococcus thermophilus* e os *Enterococcus* spp.

5.2.2 Amostras de instalações, equipamentos e utensílios

Dentre as 60 amostras analisadas de superfícies das instalações, dos equipamentos, e dos utensílios do processamento de ricota, houve uma grande variação no grau de contaminação das amostras dos diferentes pontos de amostragem. As análises revelaram desde locais com populações menores que 10 UFC/cm² ou unidade até populações superiores a 10⁷UFC/cm² (**Tabela 14**).

Tabela 14. Contagem (UFC/cm² ou unidade) de *Enterococcus* spp. em superfícies das instalações, equipamentos e utensílios em indústria processadora de ricota

Amostras	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Tanque de recepção do leite	< 10	< 10	< 10
Suporte da mangueira de entrada do soro	< 10	< 10	1,3 x10²
Tanque 2*	7,1 x10²	< 10	< 10
Bomba de transferência do soro	< 10	< 10	< 10
Caixa de recolhimento do soro	< 10	< 10	5,9 x10²
Parede	2,3 x10⁴	< 10	3,4 x10⁷
Bancada 1**	< 10	< 10	< 10
Bancada 2***	< 10	< 10	6,8 x10²
Caixa de armazenamento	< 10	< 10	< 10
Forma ^u	5,4 x10⁵	6,0 x10⁴	1,1 x10³
Prensa ^u	< 10	< 10	< 10
Tela de retenção ^u	1,6 x10⁵	< 10	4,2 x10⁶
Peneira ^u	< 10	< 10	< 10
Mexedor ^u	< 10	< 10	< 10
Pá ^u	< 10	< 10	< 10
Pote ^u	< 10	< 10	< 10
Balde de recolhimento do leite ^u	< 10	< 10	< 10
Termômetro ^u	< 10	< 10	< 10
Vassoura ^u	1,8 x10⁸	< 10	< 10
Ralo de esgotamento do soro ^u	1,2 x10⁶	< 10	3,0 x10⁶

* Tanque de processamento da ricota (tubulação de saída do soro)

** Bancada da área de enformagem

*** Bancada da área de embalagem

^u: Contagem em UFC/unidade.

Dentre as superfícies que contatam diretamente com o produto final, os valores de contagens encontrados para a forma e a tela de retenção dos grumos foram bastante preocupantes uma vez que atingiram números de $5,4 \times 10^5$ UFC/unidade na primeira coleta para forma e $4,2 \times 10^6$ UFC/unidade na terceira coleta para a tela.

A bancada 2, na qual a ricota é embalada apresentou contaminação por *Enterococcus* spp. com contagem de $6,8 \times 10^2$ UFC/cm² na terceira coleta, e menores que 10UFC/cm² nas demais coletas. Para o tanque de processamento da ricota, a contagem deste microrganismo foi de $7,2 \times 10^2$ UFC/cm² na primeira

coleta e menores que 10 UFC/cm^2 nas coletas seguintes. As superfícies dos equipamentos analisadas neste estudo (bancadas e tanque de processamento da ricota) eram de aço inoxidável.

A caixa que é utilizada para o recolhimento do soro dos queijos e que auxilia na sua transferência para o tanque de processamento da ricota (**Figura 3**) apresentou contagem na ordem de 10^2 UFC/cm^2 .



Figura 3. Caixa utilizada para o recolhimento do soro.

O tanque de processamento da ricota (tanque 2) foi analisado para a determinação de *Enterococcus* spp. na tubulação de saída do soro (**Figura 4**), por ser um local de superfície irregular, dificultando o acesso e a higienização do local. Esta superfície apresentou contagem na ordem de 10^2 UFC/cm^2 na primeira coleta.

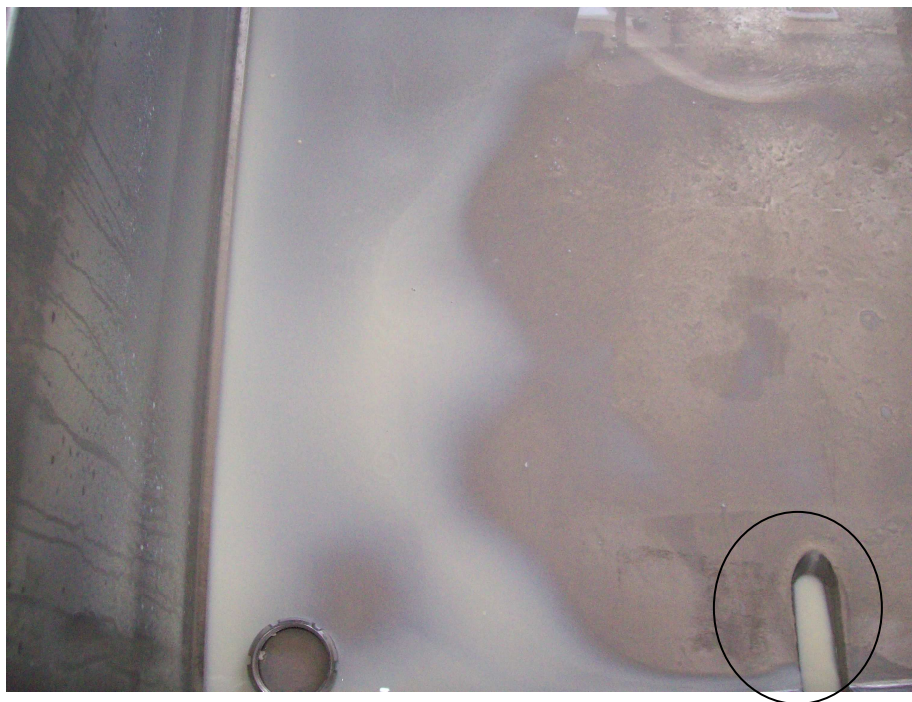


Figura 4. Tanque 2 – tubulação de saída do soro.

As amostras de utensílios como peneira, mexedor, pá, pote e termômetro apresentaram em todas as coletas contagens inferiores a 10 UFC/unidade. Estes utensílios permaneciam por longos períodos submersos em solução clorada a 2mg/L o que pode ter contribuído para as baixas contagens destes microrganismos.

A vassoura analisada é utilizada exclusivamente para remover o excesso de soro do tanque de processamento da ricota. Na primeira coleta, a contagem de *Enterococcus* spp. neste local foi de $1,8 \times 10^8$ UFC/unidade, sendo que nas coletas seguintes, as contagens permaneceram abaixo de 10 UFC/unidade. Embora a indústria não tenha feito nenhuma observação quanto a uma possível modificação no processo de higienização no período entre as três coletas realizadas, e considerando a enorme redução na contagem de *Enterococcus* spp., a partir da 2ª coleta, possivelmente deve ter ocorrido um cuidado maior neste procedimento.

No ralo de esgotamento do soro, a contaminação por *Enterococcus* spp. na primeira e terceira coletas atingiu contagens da ordem de 10^6 UFC/unidade. A

parede que foi analisada neste estudo fica localizada ao lado da bancada que se realiza a enformagem da ricota (**Figura 5**), onde muitas vezes, a ricota entra em contato com esta parede, a qual atingiu a contagem de $3,4 \times 10^7$ UFC/cm² na terceira coleta. Este conjunto de resultados revela bem a extensa disseminação dos *Enterococcus* por todo ambiente de processamento da ricota e conseqüente transferência ao produto final.



Figura 5. Formas contendo a ricota em contato com a parede analisada para a determinação de *Enterococcus* spp.

Dentre os microrganismos capazes de aderir às superfícies utilizadas no processamento de alimentos, com possível formação de biofilmes, estão às bactérias do gênero *Enterococcus*. Estes microrganismos apresentam capacidade de aderência em aço inoxidável, e por serem freqüentemente encontrados no leite, devido a suas características psicrotrófica e termodúrica, a presença deles implica

na necessidade da utilização correta de baixas temperaturas de estocagem e um programa adequado de limpeza e sanitização (ROSADO, 2009).

Gelsomino et al. (2002) sugeriram em estudo com o queijo Cheddar que uma das fontes de *Enterococcus* no produto, seria os equipamentos de ordenha, já que as cepas encontradas nestes locais também foram encontradas no queijo. Ainda observaram falhas nos procedimentos de higienização, uma vez que a contaminação microbiana permanecia nas fendas, junções, extremidades inoperantes e encaixes, podendo sobreviver e aderir, assim diretamente ao leite. A presença de *Enterococcus* mesmo após cloração foi atribuída à possível formação de biofilme.

Temelli et al. (2006) verificaram a presença de bactérias do gênero *Enterococcus* em superfícies de faca de corte, agitador de leite, prensas, bandeja, embalagens, assoalho, paredes e em mãos de manipuladores, durante o processamento de queijo, demonstrando novamente que a qualidade do produto final é função da taxa de contaminação dos equipamentos e utensílios de contato e de uma higienização eficiente, e ainda da capacidade de adesão de *Enterococcus* em tais superfícies.

Comparando-se as três coletas, observa-se que na terceira coleta os índices de contaminação por amostras ambientais devido aos *Enterococcus* spp. aparece em maior número. Além disso, observa-se que a forma de moldagem da ricota apresenta uma contaminação persistente durante as coletas, que pode estar associada a formação de biofilmes e/ou processo de sanitização ineficiente.

Ao avaliar o ar ambiente da indústria de laticínios, verificou-se que a sala de produção da ricota (início e meio da produção) na primeira e segunda coletas estavam contaminados com *Enterococcus* spp. As contagens foram de 2 UFC/placa em cada ambiente analisado.

5.2.3 Produto final

De acordo com a **Tabela 15**, verifica-se que das 15 amostras analisadas de ricota antes de serem embaladas, uma amostra, referente à primeira coleta

apresentou contagem de $2,7 \times 10^2$ UFC/g de *Enterococcus* spp. As demais amostras permaneceram com contagem deste microrganismo abaixo de 10^2 UFC/g. Em contrapartida, 100% das amostras de produto final analisadas após 21 dias de armazenamento a 4-7°C estavam contaminadas por *Enterococcus* spp. chegando a concentrações superiores a 10^7 UFC/g (**Tabela 16**).

Tabela 15. Contagem de *Enterococcus* spp. (UFC/g) na ricota antes de ser embalada

Unidade amostral*	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
RA1	$2,7 \times 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
RA2	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
RA3	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
RA4	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
RA5	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$

* RA: Ricota antes de ser embalada e após 2 horas da enformagem.

Tabela 16. Contagem de *Enterococcus* spp. (UFC/g) em ricotas

Unidade amostral*	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
RF 1	$3,0 \times 10^4$	$3,4 \times 10^3$	$3,6 \times 10^5$
RF 2	$1,5 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$	$1,4 \times 10^5$
RF 3	$2,4 \times 10^5$	$4,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^7$
RF 4	$2,6 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$8,4 \times 10^5$
RF 5	$2,3 \times 10^5$	$4,2 \times 10^3$	$2,8 \times 10^4$

* RF: Ricota embalada, análise após 21 dias de estocagem refrigerada.

Os enterococos estão presentes em uma grande variedade de queijos produzidos tanto a partir de leite cru como pasteurizado, devido ao fato de ser um microrganismo termodúrico capaz de resistir à pasteurização e ainda psicrotróficos, resistindo às temperaturas de refrigeração (GIRAFFA, 2003).

Contagens de enterococos em diferentes queijos podem variar de 10^5 a 10^7 UFC/g, sendo *E. faecium* e *E. faecalis* as espécies prevalentes isoladas. A recuperação e persistência dos enterococos em certos queijos pode ser atribuída a sua ampla gama de temperatura de crescimento e de sua tolerância a pH e sal (GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997; SUZZI et al., 2000; GIRAFFA, 2002; FRANZ et al., 2003).

Giraffa (2002) sugere que a presença de enterococos em queijos pasteurizados é geralmente devido à recontaminação após o tratamento térmico e à sua resistência frente ao calor.

No estudo realizado por Carvalho et al. (2005) para a identificação das bactérias ácido lácticas presentes em queijos tipo coalho artesanais verificou-se que *Enterococcus* foi o gênero predominante com 60,3% do total de bactérias encontradas, sugerindo que durante o processamento deste queijo, estas bactérias poderiam ser selecionadas pela sua resistência a elevadas temperaturas, como a etapa de cozimento da massa do queijo.

Os resultados obtidos em nosso trabalho sugerem algumas hipóteses; uma delas seria a possível contaminação do produto final nas etapas de pós processamento térmico, proveniente das superfícies que contataram diretamente com o produto após a enformagem, destacando neste caso, a bancada em que é realizada a embalagem da ricota como uma possível fonte de recontaminação.

Outra possível explicação para os elevados níveis de enterococos no produto final estariam relacionados à contaminação das matérias-primas utilizadas para a fabricação de ricota, pois apesar do tratamento térmico aplicado neste processo, os enterococos são resistentes a temperaturas elevadas, ocasionando uma seleção destas bactérias frente a outras menos resistentes, chegando até o produto final. Ainda poderia estar relacionada à sua exposição à temperatura ambiente por um período de 5 horas, e/ou às baixas temperaturas (7°C) utilizadas para o seu armazenamento, que possivelmente promoveriam uma seleção de *Enterococcus* spp., devido as suas características psicrófilas.

Gomes (2007) discute em seu trabalho a utilização dos enterococos como indicadores de condições higiênico-sanitárias em água e alimentos e destacam que, devido a sua maior resistência, os enterococos podem ser úteis na avaliação da eficiência de processos de desinfecção de plantas de processamento ou na avaliação da qualidade higiênico-sanitário de produtos ácidos ou congelados, nos quais os coliformes ou *E. coli* podem não sobreviver.

Devido à sua alta tolerância ao calor e sobrevivência em situações adversas no ambiente, os enterococos podem colonizar nichos diversos e podem, então, servir como indicadores da qualidade sanitária dos alimentos (GIRAFFA, 2002).

5.2.4 Identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através de Reação de Polimerização em Cadeia – PCR

Do total de 219 isolados com características de enterococos, das amostras de matéria-prima, amostras ambientais, ar ambiente e produto final, 136 foram confirmados para o gênero através dos testes de coloração de Gram, catalase, crescimento em 6,5% de cloreto de sódio, em pH 9,6, multiplicação a 10°C e a 45°C e crescimento em Ágar Bile esculina. Estes isolados confirmados foram submetidos às análises moleculares de PCR para identificação de espécie.

A identificação dos enterococos através dos testes fenotípicos tem sido problemática, especialmente com os isolados de fonte ambiental, devido à heterogeneidade das suas características (GIRAFFA, 2002).

Do total de 136 isolados, 8,1% (11/136) apresentaram resultados negativos frente à pesquisa dos genes de identificação de espécie *ddl_{E.faecium}* e *ddl_{E.faecalis}*, embora tenham apresentado resultados característicos de enterococos frente aos testes fenotípicos de confirmação de gênero, resultados estes que indicam a presença de outras espécies de enterococos (**Tabela 17**).

Tabela 17. Confirmação bioquímica do número de isolados do gênero *Enterococcus* e identificação das espécies de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR

Testes	Nº total de isolados testados	Nº de isolados positivos	% de positivos
Confirmação do gênero	219	136	62,1
PCR de <i>ddl_{E.faecium}</i>	136	97	71,3
PCR de <i>ddl_{E.faecalis}</i>	136	28	20,6
Outros enterococos	136	11	8,1

Dos 136 isolados de enterococos, 71,3% (97/136) dos isolados foram identificados como *E. faecium* e 20,6% (28/136) foram identificados como *E. faecalis* (**Tabelas 18 e 19**) através da técnica de PCR (**Figuras 6 e 7**).

Tabela 18. Origem das cepas de *E. faecium* e *E. faecalis* isoladas na linha de processamento de ricota

Amostras	Nº de cepas de <i>E. faecium</i>	Nº de cepas de <i>E. faecalis</i>	Nº total de isolados
Leite cru	7	7	14
Soro de queijo	2	0	2
Ricota embalada	64	2	66
Ricota antes da embalagem	2	0	2
Tanque de processamento de ricota	0	8	8
Bancada de processamento de ricota	5	0	5
Bancada de embalagem	0	3	3
Forma de ricota	5	0	5
Parede	5	0	5
Ralo de escoamento do soro	1	0	1
Tela de retenção dos grumos	1	3	4
Caixa de recolhimento do soro	0	5	5
Vassoura	3	0	3
Ar ambiente	2	0	2

Tabela 19. Total do número de cepas de *E. faecium* e *E. faecalis* provenientes de matéria-prima, produto final e amostras ambientes

Amostras	PCR de ddl <i>E. faecium</i> (%)	PCR de ddl <i>E. faecalis</i> (%)
Matéria-prima	9 (9,3)	7 (25,0)
Produto final	66 (68,1)	2 (7,1)
Amostras ambientais	22 (22,6)	19 (67,9)

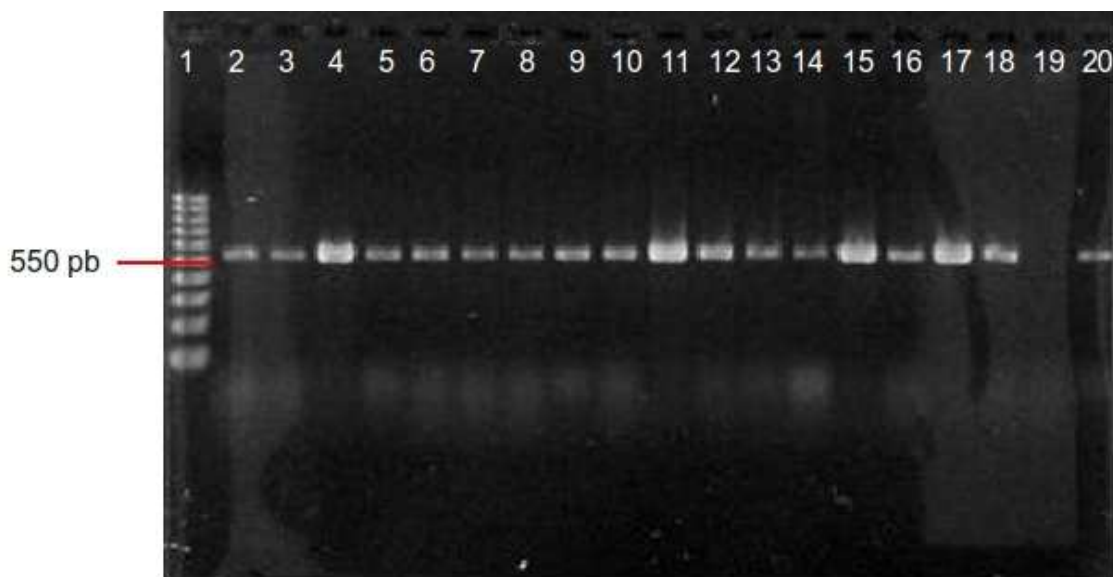


Figura 6. Foto ilustrativa do gel de agarose contendo produto de PCR do gene de identificação de espécies. Canaleta 1: Marcador molecular (100pb); 2 a 18: *E. faecium* isolados de amostras de ricota; 19: controle negativo; 20: controle positivo de *E. faecium* ATCC 6562 (550 pb).

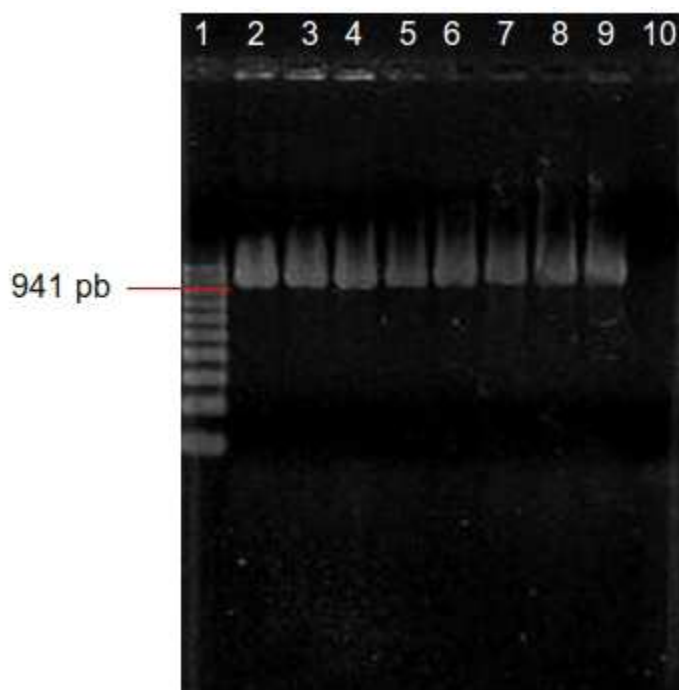


Figura 7. Foto ilustrativa de gel de agarose contendo produto de PCR do gene de identificação de espécies. Canaleta 1: Marcador molecular (100pb); 2 a 9: controle positivo de *E. faecalis* ATCC 29212 (941 pb). Canaleta 10: Controle negativo.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram a predominância das espécies *E. faecium* e *E. faecalis* nas amostras de ricotas, assim como já se reportaram em outros estudos com diferentes tipos de queijos (SUZZI et al.; 2000; ÇITAK, YUCEL, ORHAN, 2004; CAVALCANTE et al., 2007; SABIÁ et al., 2008; CARIOLATO; ANDRIGHETTO, LOMBARDI, 2008; GOMES et al., 2008; ANDRADE, 2009).

De acordo com Kielwein (1978) *apud* Çitak, Yucel, Orhan (2004), *E. durans* e *E. faecium* prevalecem em leite e produtos lácteos sendo que ambos são originários da limpeza inadequada de equipamentos.

Wessels; Jooste; Mostert (1988) verificaram que *E. faecalis* (73,4% dos isolados) foi a espécie predominante no queijo Cottage. A mesma espécie de enterococos também foi predominante entre os microrganismos encontrados no leite cru (DEVRIESE et al. 1995).

Os estudos relatados por Suzzi et al. (2000) e Pinto et al. (1999) revelaram que as espécies de *E. faecium* e *E. faecalis* são as mais comumente isoladas de amostras ambientais em indústria de laticínios, como observado no nosso estudo. A presença de enterococos indesejáveis pode causar problemas de deterioração, e pode manifestar-se das más condições de higiene durante a produção de queijo.

Os resultados globais dos testes bioquímicos para confirmação de gênero enterococos e identificação das espécies *E. faecium* e *E. faecalis* dos isolados das amostras, são apresentados nas **Tabelas C1, C2 e C3 do Apêndice C**.

5.2.5 Avaliação dos fatores de virulência

Todos os isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* referentes às amostras de produto final (ricota depois de embalada) foram submetidos às análises fenotípicas de gelatinase, hemolisina e termonuclease, totalizando 66 amostras.

Nas avaliações fenotípicas do potencial de virulência (**Tabela 20**), o perfil β -hemolítico foi observado em 90,6% (58/64) dos isolados de *E. faecium* e 50% (1/2) dos isolados de *E. faecalis*.

Para o teste fenotípico de gelatinase, nenhum dos isolados apresentou resultado positivo. Para o teste de termonuclease, 100% (64) dos isolados de *E. faecium* e 50% (1/2) dos isolados de *E. faecalis* apresentaram resultados positivos.

Tabela 20. Avaliação fenotípica de fatores de virulência de isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* de amostras de ricota depois de embaladas

Nº total de isolados	Nº de isolados positivos (%)		
	Termonuclease	Hemolisina	Gelatinase
<i>E. faecium</i> 64	64 (100,0)	58 (90,6)	0 (0,0)
<i>E. faecalis</i> 2	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)

Os resultados globais das análises fenotípicas de fatores de virulência de *E. faecium* e *E. faecalis* dos isolados das amostras, estão apresentados na **Tabela D1 do Apêndice D**.

Enterococcus são considerados patógenos oportunistas, o que pode causar uma variedade de infecções em pacientes que têm patologias graves ou que são imunodeprimidos. O principal enterococos responsável por infecções humanas (mais de 80%) é o *E. faecalis* seguido do *E. faecium* com uma incidência muito menor que outras espécies de enterococos (FRANZ; HOLZAPFEL; STILES, 1999; MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000).

Têm-se observado que *E. faecalis* e *E. faecium* mostram diferenças significativas na incidência de fatores de virulência. Franz et al. (2001) constataram que 10,4% das cepas de *E. faecium* foram positivas para um ou mais determinantes de virulência, em comparação aos 78,7% das cepas de *E. faecalis*. Da mesma forma, todas as cepas de *E. faecalis* testadas por Eaton e Gasson (2001) possuíam múltiplos determinantes (entre 6 e 11), enquanto que isolados de *E. faecium* foram, em geral, livres de fatores de virulência.

De acordo com Franz et al. (2003) geralmente a incidência dos determinantes de virulência entre as cepas de *E. faecium* é baixa quando comparada com *E.*

faecalis, provavelmente pela presença de plasmídeos autotransmissíveis induzidos por feromônios. Isto pode ser explicado pelo fato de que alguns genes codificados em plasmídeos regulados por exposição aos feromônios têm a capacidade de transferência em alta frequência. Estes plasmídeos geralmente ocorrem apenas entre as cepas de *E. faecalis*, o que poderia explicar a maior incidência de fatores de virulência entre as cepas desta espécie.

Os resultados obtidos no nosso estudo, diferentemente dos encontrados na literatura, revelaram uma presença maior de cepas de *E. faecium* positivas a dois fatores de virulência avaliados.

Gelatinases são endopeptidases capazes de hidrolisar gelatina, colágeno e outras proteínas. Elas são produzidas por grande parte dos *E. faecalis* isolados de pacientes hospitalizados e pacientes com endocardite e podem contribuir para uma maior severidade de endocardites em modelos animais (SEDGLEY et al., 2005; CARIOLLATO; ANDRIGUETO; LOMBARDI, 2008).

A gelatinase é um fator de virulência que não é produzido por todos enterococos isolados de humanos e tem sido muito estudada em *E. faecalis* (ANDRADE, 2009). Gomes (2008) verificou que das 80 cepas isoladas de alimentos analisadas, 60% produziram gelatinase. A espécie de *E. faecium* não apresentou resultado positivo para avaliação fenotípica de produção de gelatinase. Para a pesquisa da atividade hemolítica, dos 263 isolados de *Enterococcus* spp., 81% apresentaram atividade hemolítica parcial (tipo alfa), 12% apresentaram atividade hemolítica total (tipo beta) e 7% não apresentaram atividade hemolítica (tipo gama). O perfil β -hemolítico foi observado em um isolado de *E. faecium* e em 31 isolados de *E. faecalis*.

Nascimento (2007) ao avaliar uma cultura de *E. faecium* FAIR-E 198 verificou que a mesma não apresentava atividade de gelatinase, termonuclease e hemolisinas, sendo, portanto, considerada como uma cultura sem potencial de patogenicidade.

Alguns estudos têm demonstrado que os *E. faecium* e *E. faecalis* apresentam o gene *gelE* e *cylL*, embora os testes fenotípicos não expressem a atividade de

gelatinase e hemólise (EATON; GASSON, 2001; SEDGLEY et al., 2005; SABIÁ et al., 2008).

A falta de atividade fenotípica pode ser explicada por baixos níveis ou baixa regulação de expressão genética ou por um produto genético inativo. Como os fatores ambientais podem influenciar fortemente a expressão genética, é necessário levar em consideração que as condições “*in vitro*” usadas para testar os caracteres fenotípicos são diferentes daquelas encontradas no corpo do ser humano. Genes silenciosos, também podem se tornar ativados por fatores ambientais, tais como as condições encontradas no trato gastrointestinal, do equilíbrio dos microrganismos na flora intestinal, os efeitos do sinergismo bacteriano, bem como a presença e persistência de um grande número de enterococos viáveis. Por estas razões, os enterococos deveriam ser avaliados não apenas pelas expressões de traços de virulência “*in vitro*”, mas também usando ensaios moleculares os quais podem evidenciar estes genes silenciosos que podem ser ativados mudando estas bactérias para potenciais patógenos ou enfatizando sua patogenicidade (EATON; GASSON, 2001; SABIÁ et al., 2008).

Os enterococos possuem mecanismos altamente eficazes de transferência de genes, pois os genes de virulência estão associados com alguns plasmídeos altamente transmissíveis. Assim, existe um grande risco de uma cepa que não possuía os genes de virulência possa adquiri-los por conjugação. Neste contexto de culturas *starters* e probióticas, é possível que um grande número de bactérias viáveis possam ser consumidas. Isto proporcionaria uma grande população beneficiária, no qual os genes de virulência que possuem plasmídeos transmissíveis poderiam se espalhar (EATON; GASSON, 2001).

O estudo de Sabiá et al. (2008) observou que além da produção de bacteriocina e resistência à vancomicina outros traços biológicos como a expressão de hemólise e gelatinase foram detectados, que são considerados fatores de virulência em modelos animais ainda que o seu papel na patogenicidade não seja sempre demonstrado. A análise molecular feita para a avaliação de citolisina e gelatinase, também mostrou em muitos casos a falta da

expressão fenotípica em presença dos determinantes *cyiL* e *gelE* e esse genes silenciosos foram igualmente distribuídos em cepas de diferentes fontes. Logo, a presença dos genes da citolisina e gelatinase não implica necessariamente na capacidade de expressar o fenótipo correlacionado.

O isolamento de enterococos hemolíticos a partir de alimentos pode ter implicações sanitárias (EATON; GASSON, 2001; FRANZ et al., 2001). Por este motivo, a ausência de atividade hemolítica deve ser considerada um importante critério para a seleção de culturas iniciadoras úteis na produção de alimentos fermentados.

5.2.6 Resistência aos antimicrobianos

O perfil de resistência a 5 antimicrobianos de uso clínico foi analisado em 7 cepas de *E. faecalis* (**Tabela 21**) e 47 cepas de *E. faecium* (**Tabela 22**) isoladas de matéria-prima (leite cru e soro de queijo) e ricota antes e depois de ser embalada, totalizando 54 amostras.

Tabela 21. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos segundo o método de disco-difusão em ágar de isolados de *E. faecalis* obtidos de amostras de leite cru e ricota

Amostra*	Antimicrobianos				
	Gentamicina (120µg)	Tetraciclina (30µg)	Cloranfenicol (30µg)	Vancomicina (30µg)	Eritromicina (15µg)
LC1 (1)	I	R	R	R	R
LC1 (2)	I	R	R	R	R
LC2 (1)	I	R	R	R	R
LC2 (3)	I	R	R	R	R
LC3 (3)	I	R	R	R	R
RF3 (2)	I	I	R	R	R
RF4 (2)	S	I	R	R	R

* LC: Leite Cru; RF: Ricota Final; o número entre parênteses representa o número do isolado referente à mesma amostra.

R: Resistente; I: Intermediário; S: Sensível.

As **Figuras 8** e **9** ilustram que nenhum dos isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* apresentou resistência a todos os antibióticos testados, mas que a maioria deles foram resistentes pelo menos a três antimicrobianos testados.

De acordo com a **Figura 8 (a)**, pode-se verificar que todas as cepas de *E. faecalis* (100%) isoladas de leite cru foram resistentes frente aos antibióticos tetraciclina, cloranfenicol, vancomicina e eritromicina. **A Figura 8 (b)** mostra que 100% das cepas isoladas de ricota depois de embalada foram resistentes à cloranfenicol, vancomicina e eritromicina. A metade dos isolados (50%) foi sensível frente a gentamicina.

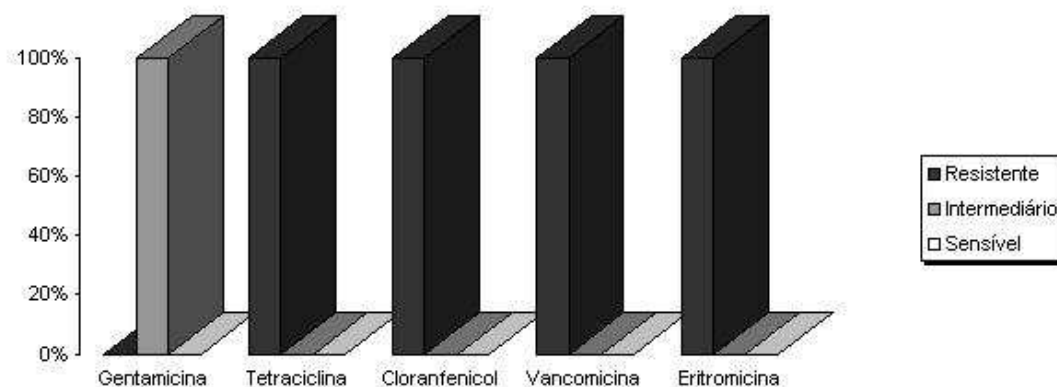
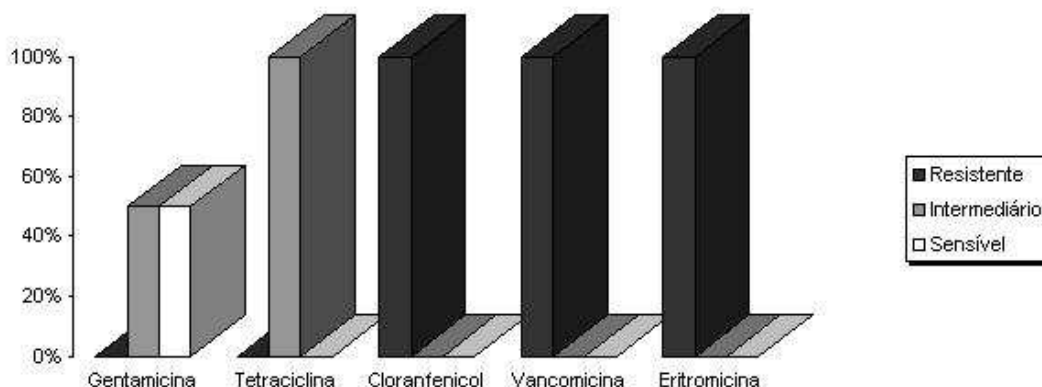
a**b**

Figura 8. Perfil de resistência (%) de 7 cepas de *E. faecalis* a antibióticos de uso clínico isolados a partir de amostras de leite cru (a) e ricota (b).

Tabela 22. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos segundo o método de difusão em Ágar de isolados de *E. faecium* obtidos de amostras de matéria-prima e ricota

Amostra*	Antimicrobianos				
	Gentamicina (120µg)	Tetraciclina (30µg)	Cloranfenicol (30µg)	Vancomicina (30µg)	Eritromicina (15µg)
LC1 (3)	R	R	R	R	R
LC2 (4)	I	R	R	R	R
LC3 (1)	I	R	R	R	R
LC3 (4)	I	R	R	R	R
S7 (1)	I	R	R	R	R
RA1 (1)	S	R	R	R	R
RA1 (2)	S	I	R	R	R
RF1 (1)	S	I	I	R	R
RF1 (2)	S	R	R	R	R
RF1 (3)	S	R	R	R	R
RF2 (1)	I	R	R	R	R
RF2 (2)	S	R	I	R	R
RF2 (3)	S	R	R	R	R
RF3 (1)	I	R	R	R	R
RF3 (3)	S	R	R	R	R
RF4 (1)	S	I	R	R	R
RF4 (3)	S	R	R	R	R
RF5 (1)	S	R	I	R	R
RF5 (2)	S	I	R	R	R
RF5 (3)	S	R	R	R	R
RF6 (1)	I	R	R	R	R
RF6 (3)	I	R	R	R	R
RF6 (4)	I	R	I	R	R
RF7 (1)	I	I	R	R	R
RF7 (4)	I	R	I	R	R
RF8 (1)	I	R	R	R	R
RF8 (2)	I	I	R	R	I
RF8 (3)	I	R	I	R	I
RF9 (1)	I	R	R	R	R
RF9 (2)	I	R	R	R	I
RF9 (4)	I	R	R	R	I
RF10(1)	I	S	I	R	I
RF10(2)	I	I	R	R	I
RF10(3)	I	R	R	R	R
RF11(1)	S	R	R	R	R
RF11(2)	I	R	R	R	I
RF12(1)	S	R	R	R	R
RF12(2)	I	I	R	R	R
RF12(3)	I	R	R	R	R
RF13(1)	I	R	R	R	R
RF13(2)	S	R	R	R	I
RF13(3)	S	I	I	R	R

Continuação...

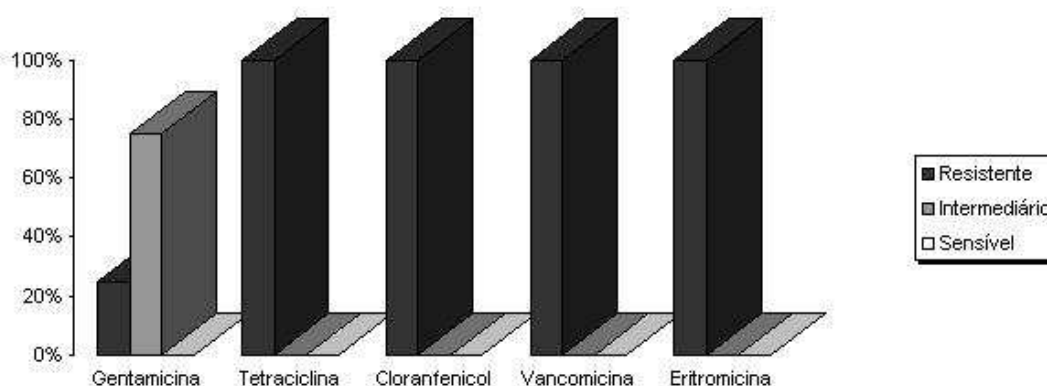
RF14(1)	I	R	R	R	R
RF14(2)	I	R	R	R	R
RF14(4)	I	R	R	R	R
RF15(1)	S	R	I	R	R
RF15(3)	S	R	R	R	R

* LC: Leite Cru; S: Soro de queijo; RA: Ricota antes de ser embalada; RF: Ricota Final; o número entre parênteses representa o número do isolado referente à mesma amostra.

R: Resistente; I: Intermediário; S: Sensível.

De acordo com a **Figura 9 (a)** e **(b)**, pode-se observar que as cepas de *E. faecium* isoladas de leite cru e soro de queijo foram 100% (5/5 isolados) resistentes à tetraciclina, cloranfenicol, vancomicina e eritromicina. A **Figura 9 (c)** mostra que as 2 cepas isoladas da ricota antes de ser embalada (100%) foram resistentes frente aos antibióticos cloranfenicol, vancomicina e eritromicina. Entretanto, 100% (2/2 isolados) foram sensíveis à gentamicina. As cepas isoladas da ricota depois de embalada apresentaram uma maior variação no grau de resistência frente aos diferentes antimicrobianos, sendo de 100% (40/40 isolados) de resistência apenas para a vancomicina. 80% (32/40) das cepas foram resistentes à eritromicina, 78% (31/40) frente à tetraciclina e cloranfenicol. Além disso, 43% (17/40) das cepas foram sensíveis frente à gentamicina e 3% (1/40) à tetraciclina (**Figura 9 (d)**).

a



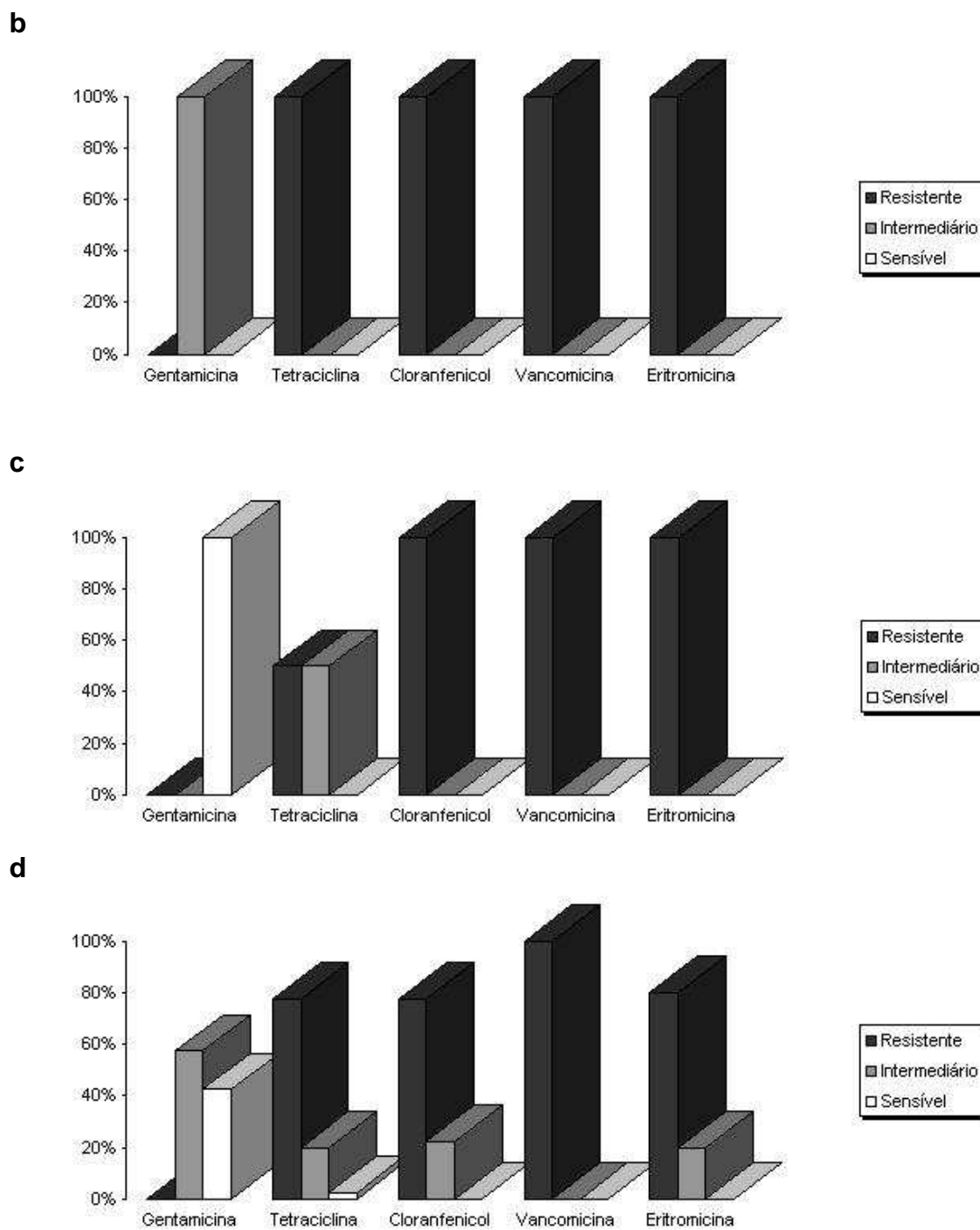


Figura 9. Perfil de resistência (%) de 47 cepas de *E. faecium* a antibióticos de uso clínico isolados a partir de amostras de leite cru (a), soro de queijo (b), ricota antes de embalada (c) e ricota depois de embalada (d).

Enterococos são conhecidos por causar doenças graves em seres humanos e estão se tornando um importante e crescente problema de infecção nosocomial devido à aquisição de resistência a antibióticos. A resistência adquirida aos antibióticos, combinados com a resistência natural a várias classes de antibióticos e a resistência natural destes microrganismos por baixo pH, elevadas concentrações de sal e altas temperaturas, contribui para a sua sobrevivência (EATON; GASSON, 2001).

Dados sobre a incidência de enterococos resistentes à vancomicina permanecem controversos. Alguns trabalhos indicam pouco ou ausência dos genes de resistência *vanA* e *vanB* em enterococos isolados de queijo (ANDRIGHETTO et al., 2001; JURKOVIC et al., 2006; MORANDI et al., 2006). Entretanto, resistência à vancomicina foi encontrada em 96,8% das cepas de *E. faecalis* e 76% dos *E. faecium* isoladas de um tipo de queijo branco da Turquia (ÇITAK; YUCEL; ORHAN, 2004).

Em um estudo recente, o gene *vanA* foi encontrado em 37% dos enterococos isolados de leite, todavia, todos foram sensíveis à vancomicina (RIBEIRO et al., 2007).

Batish; Ranganathan (1986) constataram que cerca de 80% dos *Enterococcus* isolados de amostras de leite apresentaram diferentes graus de resistência a cloranfenicol, eritromicina, estreptomina, tetraciclina e gentamicina.

Além dos fatores de virulência já discutidos, é reconhecido que a presença de enterococos em alimentos é controversa devido ao aumento da ocorrência de cepas resistentes aos antibióticos de uso clínico e relacionadas a infecções nosocomiais. De acordo com a **Tabela 23** observa-se que os isolados de amostras de ricota depois de embalada que apresentaram resultado positivo para os testes fenotípicos de patogenicidade (termonuclease e hemolisina) também apresentam resistência a pelo menos um antimicrobiano de uso clínico testados.

Tabela 23. Relação entre os testes fenotípicos de patogenicidade e resistência aos antimicrobianos de isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* de amostras de ricota depois de embalada

Espécie	Amostra*	Termonuclease	Hemolisina	Resistência aos antimicrobianos
<i>E. faecium</i>	RF1 (1)	+	+	VAN, ERI
	RF1 (2)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI
	RF1 (3)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI
	RF2 (1)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI
	RF2 (2)	+	+	TET, VAN, ERI
	RF2 (3)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI
	RF3 (1)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI
	RF3 (3)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI
	RF4 (1)	+	+	CLO, VAN, ERI
	RF4 (3)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI
	RF5 (1)	+	+	TET, VAN, ERI
	RF5 (2)	+	+	CLO, VAN, ERI
	RF5 (3)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI
	RF6 (1)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI
	RF6 (3)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI
	RF6 (4)	+	+	TET, VAN, ERI
	RF7 (1)	+	+	CLO, VAN, ERI
	RF7 (4)	+	+	TET, VAN, ERI
	RF8 (1)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI
	RF8 (2)	+	+	CLO, VAN
	RF8 (3)	+	+	TET, VAN
	RF9 (1)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI
	RF9 (2)	+	+	TET, CLO, VAN
	RF9 (4)	+	+	TET, CLO, VAN
	RF10 (1)	+	+	VAN
	RF10 (2)	+	+	CLO, VAN
	RF10 (3)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI
	RF11 (2)	+	+	TET, CLO, VAN
	RF12 (1)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI
	RF12 (2)	+	+	CLO, VAN, ERI
	RF12 (3)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI
	RF13 (2)	+	+	TET, CLO, VAN
RF14 (1)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI	
RF14 (2)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI	
RF14 (4)	+	+	TET, CLO, VAN, ERI	
RF15 (1)	+	+	TET, VAN, ERI	
<i>E. faecalis</i>	RF3 (2)	+	+	CLO, VAN e ERI

*RF: Ricota Final; o número entre parênteses representa o número do isolado referente à mesma amostra.
TET: Tetraciclina (30µg); CLO: Cloranfenicol (30µg); VAN: Vancomicina (30µg); ERI: Eritromicina (15µg).

O estudo de Cariollato, Andrighetto, Lombardi (2008) mostrou que as linhagens de *E. faecium* isoladas de queijos possuíram maior número de resistência aos antibióticos testados do que *E. faecalis*.

Diante do exposto, este trabalho indica a necessidade de um constante acompanhamento dos enterococos presente nos animais e nos produtos alimentícios, considerando sua importância como vetores para a transferência de microrganismos através da cadeia alimentar dos seres humanos. Além disso, como a adição de fermentos em alimentos está em crescente aumento, as propostas para aplicações biotecnológicas destes microrganismos ou destas culturas em alimentos devem ser precedidas por uma investigação da presença da resistência a antibióticos e de fatores de virulência.

5.3 Avaliação da qualidade microbiológica de ricotas

5.3.1 Conformidade com os Padrões Legais

As amostras de ricotas embaladas foram avaliadas, após 21 de estocagem refrigerada (4-7°C), quanto à conformidade aos padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC 12/2001 da ANVISA (BRASIL, 2001), complementados pela avaliação de *B. cereus* e *Enterococcus* spp.

De acordo com os dados encontrados na bibliografia (ESPER, 2006), a ricota pode ser classificada como “queijo de muita alta umidade ($\geq 55\%$)”, e, portanto, os critérios microbiológicos são os descritos na **Tabela 24**:

Tabela 24. Padrões microbiológicos para queijos de muita alta umidade segundo a Resolução RDC ANVISA nº12/2001

Parâmetros	Critérios para amostra indicativa
Coliformes a 45°C	5×10^2 UFC ou NMP/g
Estafilococos coagulase positiva	5×10^2 UFC ou NMP/g
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência em 25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausência em 25g

Fonte: ANVISA (2001).

Os resultados das análises microbiológicas das ricotas, para os parâmetros estabelecidos pela RDC ANVISA 12/2001 são apresentados na **Tabela 25**, onde

são destacadas as amostras nas quais foram obtidos valores em desacordo com o padrão estabelecido.

Do total de 15 amostras avaliadas, 13,33% (2/15) estavam em desacordo com o padrão regulamentar vigente para o limite máximo permitido para estafilococos coagulase positiva. No entanto, em nenhuma amostra foi detectada a presença de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e coliformes termotolerantes.

Tabela 25. Avaliação microbiológica de ricotas de acordo com os parâmetros da Resolução RDC ANVISA nº 12/2001

Amostra*	Coliformes a 45°C (NMP/g)	Estafilococos coagulase + (UFC/g)	<i>Salmonella</i> sp. em 25g	<i>Listeria monocytogenes</i> em 25g
RF 1	< 3	< 10 ²	Ausência	Ausência
RF 2	< 3	< 10 ²	Ausência	Ausência
RF 3	< 3	< 10 ²	Ausência	Ausência
RF 4	< 3	2,2 x10⁴	Ausência	Ausência
RF 5	< 3	< 10 ²	Ausência	Ausência
RF 6	< 3	< 10 ²	Ausência	Ausência
RF 7	< 3	< 10 ²	Ausência	Ausência
RF 8	< 3	< 10 ²	Ausência	Ausência
RF 9	< 3	< 10 ²	Ausência	Ausência
RF 10	< 3	< 10 ²	Ausência	Ausência
RF 11	< 3	< 10 ²	Ausência	Ausência
RF 12	< 3	< 10 ²	Ausência	Ausência
RF 13	< 3	< 10 ²	Ausência	Ausência
RF 14	< 3	< 10 ²	Ausência	Ausência
RF 15	< 3	1,9 x10⁵	Ausência	Ausência

* RF: Ricota embalada, após 21 dias de estocagem refrigerada.

5.3.2 Coliformes a 45°C

Para a produção da ricota utiliza-se leite pasteurizado e temperaturas elevadas na coagulação da massa (92 – 93°C), fazendo com que o produto, nestas condições, apresente um menor grau de contaminação. Fato este confirmado neste estudo onde mostra que em 100% (15/15) das amostras a contagem de coliformes termotolerantes foi ausente, evidenciando que as condições de higiene em que este queijo foi processado são satisfatórias.

Ribeiro et al. (2005) encontraram valores de coliformes termotolerantes $<0,3$ NMP/g em 100% das amostras de ricota cremosa analisadas, em todos os períodos de estocagem avaliados.

No entanto, vários estudos têm demonstrado a presença deste grupo de microrganismos em níveis elevados no produto final, como Raimundo (2004) que verificou 83,3% de ricotas fora do padrão para coliformes termotolerantes e Esper (2006) que observou uma elevada incidência de coliformes termotolerantes nas amostras de ricota, onde 46,7% (21/45) estavam acima do limite permitido (5×10^2 NMP/g).

A presença e o elevado nível de coliformes termotolerantes têm sido relatados em outros trabalhos científicos (LOUGUERCIO; ALEIXO, 2001; MENÉNDEZ et al., 2001; ALMEIDA FILHO; NADER FILHO, 2002; CARVALHO, 2003; BORGES, 2006) envolvendo a produção de queijos a partir de leite cru ou que utilizam tratamentos térmicos mais brandos.

5.3.3 Estafilococos coagulase positiva

A presença de estafilococos coagulase positiva nas amostras de ricota ocorreu em 13,3% (2/15), correspondendo a dias de processamento distintos. No entanto, as duas amostras que apresentaram coagulase positiva, estavam acima do limite máximo permitido pela legislação com contagens de $2,2 \times 10^4$ e $1,9 \times 10^5$ UFC/g.

Postula-se que seja necessária uma contagem entre 10^5 e 10^6 UFC de *S. aureus* por grama de alimento para que ocorra a produção de toxinas em níveis capazes de provocar intoxicação (LEITÃO, 1988; FDA, 1998; ICMSF, 1998), fato este observado para uma das amostras em nosso trabalho.

Em pesquisa realizada por Esper (2006), das 45 amostras de ricotas avaliadas, apenas duas apresentaram contagens de estafilococos coagulase positiva $> 10^2$ UFC/g, e apenas uma delas fora do padrão legal, com contagem de $4,7 \times 10^3$ UFC/g.

Normano et al. (2005) analisaram 194 amostras de ricotas e destas 24,2% (47/194) estavam contaminadas com estafilococos coagulase positiva, sendo 6 identificadas como *S. aureus* e 5 destas (83,3%; 5/6) foram produtoras das enterotoxinas SEA e SED. Segundo o autor a contaminação se devia às condições pós-processamento.

A presença de estafilococos coagulase positiva nas amostras de ricota analisadas no nosso estudo sugere que embora esse microrganismo pudesse já estar presente no leite, a detecção do mesmo em ricota elaborada com leite pasteurizado foi fruto de sua contaminação posterior, pois o tratamento térmico é eficiente em eliminar células viáveis desse microrganismo. Portanto, em razão de estafilococos serem comumente encontrados nas fossas nasais, garganta e pele de portadores humanos, possivelmente os manipuladores sejam uma das principais fontes de contaminação da ricota.

5.3.4 *Salmonella*

A ausência de *Salmonella* spp. foi observada em 100% (15/15) das amostras avaliadas. Este resultado já era prenunciado, uma vez que em todas as amostras o indicativo da presença de coliformes termotolerantes (item 5.3.2) tinham resultado em valores inferiores ao limite de detecção (<3 NMP/g).

Estes resultados se assemelham àqueles encontrados por Souza; Porto (2006) e Esper (2006) que não detectaram a presença de *Salmonella* spp. nas ricotas analisadas.

De acordo com Esper (2006) alguns fatores como a possível competição entre as diversas espécies microbianas presente e o estresse gerado durante o processamento e estocagem do produto podem justificar, em parte, o baixo potencial deste alimento para o crescimento de *Salmonella* sp.

5.3.5 *Listeria monocytogenes*

Em nenhuma das 15 amostras de ricota analisadas verificou-se a presença de *Listeria monocytogenes*.

De acordo com o estudo realizado por Esper (2006), das 45 amostras de ricotas analisadas, 6,7% foram positivas para *Listeria monocytogenes*, fato preocupante, já que este produto é consumido muitas vezes sem qualquer tipo de tratamento térmico, em sanduíches naturais e patês, podendo causar surtos como aqueles descritos por Linnan et al. (1988) e Gaulin et al. (2003) envolvendo o consumo de produtos lácteos.

Kabuki (2004) rastreou *Listeria* em plantas de produção de queijos frescos, detectando elevada contaminação por *L. monocytogenes* em pisos (30%) e drenos (20,6%).

Em contrapartida, o estudo realizado por Rocha (2004) das 25 amostras de queijo Minas frescal analisadas durante as cinco coletas não foi encontrada *Listeria*. A baixa ocorrência do microrganismo em queijo também foi descrita em pesquisa realizada por Cassarotti; Gallo; Camargo (1994) que não isolaram o microrganismo em 20 amostras do mesmo tipo de queijo. Slade (1992) consideram que o crescimento de *Listeria* spp. parece ser dependente de sua habilidade de superar com sucesso os microrganismos competidores.

5.4 Avaliação microbiológica complementar

Além dos parâmetros microbiológicos definidos pela Resolução RDC ANVISA nº12/2001, neste trabalho pesquisou-se ainda outros microrganismos que pudessem servir como parâmetro de avaliação das condições higiênicas no processamento de ricota, como *Bacillus cereus* e *Enterococcus* spp.- já apresentados neste trabalho - além dos estafilococos coagulase negativa.

Apesar da incidência de estafilococos coagulase positiva ter sido relativamente baixa neste estudo (2/15), uma análise complementar revelou um fato preocupante, que foi a constatação de um elevado índice de amostras (86,7%; 13/15) com a presença de estafilococos coagulase negativa (**Tabela 26**), com contagens de até 10^6 UFC/g. A importância deste dado está relacionada à capacidade potencial destas cepas em produzir toxinas, as quais já foram correlacionadas a surtos de intoxicação alimentar (PEREIRA; PEREIRA, 2005).

Tabela 26. Contagem de estafilococos coagulase negativa em amostras de ricota

Amostra*	Estafilococos coagulase negativa (UFC/g)
RF 1	$1,3 \times 10^5$
RF 2	$1,8 \times 10^5$
RF 3	$8,2 \times 10^5$
RF 4	$< 10^2$
RF 5	$1,4 \times 10^6$
RF 6	$5,9 \times 10^4$
RF 7	$1,9 \times 10^5$
RF 8	$6,2 \times 10^4$
RF 9	$3,4 \times 10^5$
RF 10	$6,4 \times 10^4$
RF 11	$8,3 \times 10^5$
RF 12	$4,9 \times 10^5$
RF 13	$6,3 \times 10^5$
RF 14	$4,9 \times 10^6$
RF 15	$< 10^2$

* RF: Ricota embalada, após 21 dias de estocagem refrigerada.

Pesquisas com *Staphylococcus* spp. coagulase negativa têm demonstrado potencial enterotoxigênico em alimentos (LI; CHENG, 1997; OLIVEIRA, 1999).

Em 1999, no Brasil, um surto foi associado ao consumo de leite cru (CARMO et al., 2002) do qual não se conseguiu isolar nenhuma espécie coagulase positiva. Apenas estafilococos coagulase negativa (ECN), produtores de EEC e EED, foram isolados e em contagens superiores a $2,0 \times 10^8$ UFC/g. A contaminação do leite ocorreu devido à mastite do gado leiteiro.

De acordo com Esper (2006), dentre 13 isolados positivos para produção de enterotoxina por estafilococos coagulase positiva e negativa em ricota, 9 foram caracterizados como coagulase negativa, reforçando o perigo que estes microrganismos podem representar para a população.

A contaminação da ricota com este microrganismo pode estar associada a condições higiênicas insatisfatórias da indústria processadora de ricota, bem como ao manuseio da ricota sem o devido controle higiênico uma vez que estes patógenos compõem a microbiota do homem.

5.5 Avaliação da potabilidade de água

No Brasil, a Portaria nº18 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde (Brasil, 2004) define os padrões de potabilidade da água com base nas exigências da Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelecendo que a água potável para consumo humano deve seguir os padrões microbiológicos de ausência para coliformes a 45°C ou *Escherichia coli* em 100ml. Além disso, descreve que a contagem de bactérias heterotróficas não deve exceder a 500UFC/ml.

De acordo com a **Tabela 27**, pode-se verificar que a água utilizada pela empresa produtora de ricota nas coletas 2 e 3 estava de acordo com a legislação vigente, por apresentar ausência de coliformes a 45°C e contagem total de aeróbios mesófilos menor que 1UFC/ml. Entretanto, na primeira coleta, observou-se uma elevada contagem total de aeróbios mesófilos ($1,2 \times 10^5$ UFC/ml).

Tabela 27. Avaliação microbiológica da água utilizada na fabricação da ricota

Amostra*	Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/ml)	Coliformes a 45°C (NMP/100ml)	Coliformes totais (NMP/100ml)
A1	$1,2 \times 10^5$	Ausência	> 23
A2	< 1	Ausência	< 1,1
A3	< 1	Ausência	< 1,1

* Amostra de água de processamento de cada coleta.

A água, embora não seja uma matéria-prima para a fabricação da ricota, é utilizada para remover o excesso de espuma formado após a massa atingir a temperatura entre 90 – 93°C. Desta forma, a água entra em contato direto com o produto final. Daí, a importância de se utilizar a água potável e de qualidade, uma vez que após este contato, nenhum tratamento subsequente será capaz de eliminar a microbiota proveniente da água utilizada e conseqüente contaminação da ricota.

Embora a contagem de coliformes a 45°C da água tenha sido menor que 1,1 NMP/100ml, a **Tabela 27** indica níveis elevados de coliformes totais encontrados na primeira coleta.

Pereira; Sá; Pereira (2009), em pesquisa avaliando amostras de água utilizadas na produção do queijo Minas da Serra da Canastra não encontraram contagem para coliformes totais e fecais, estando elas de acordo com a legislação vigente. Neste trabalho, todavia, não foi avaliada a contagem de bactérias heterotróficas.

Entretanto, as amostras de água analisadas no nosso estudo não estavam contaminadas com *B. cereus* e *Enterococcus* spp.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e na discussão apresentada, pode-se concluir que:

- No processamento de ricota a contaminação por *Enterococcus* spp. e *Bacillus cereus* é amplamente disseminada por todos os setores do estabelecimento revelando as características de ubiquidade e capacidade de adaptação a parâmetros extrínsecos adversos. Os níveis de contaminação podem alcançar valores associados a doses causadoras de doenças.
- Os tratamentos térmicos utilizados no processamento da ricota embora reduzam os níveis da população de *Enterococcus* spp. não os eliminam, portanto, estas etapas não podem ser definidas como pontos críticos de controle para esses microrganismos.
- A presença de fatores de patogenicidade ou virulência bem como a resistência a antimicrobianos observados para os isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* obtidos de amostras de ricota merece destaque para futuros trabalhos de pesquisa.

7 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijo tipo Minas frescal de produção artesanal comercializado em Poços de Caldas, MG. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, nº102/103, p.71-73, 2002.
- ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C.; RODRICK, G. E. *Listeria monocytogenes*: Importância e distribuição nos alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 13, nº61, p.23,1999.
- American Public Health Association: *In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 16th Ed, APHA, Washington, D.C., 1985.
- ANDRADE, C. R. **Diagnóstico da qualidade microbiológica de Queijo Serra da Canastra e caracterização de bactérias do gênero *Enterococcus***. Campinas, 2009. 112p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- ANDRIGUETTO, C.; KNIJFF, E.; LOMBARDI, A.; TORRIANI, S.; VANCANNEYT M.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; DELLAGLIO, F. Fenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian chesses. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 303-316, 2001.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4a ed. Washington: APHA, 2001.
- ANDERSSON, A.; RONNER, U.; GRANUM, P. E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p.145-155, 1995.
- ANDREWS, H. W.; FLOWERS, R. S; SILIKERS, J.; BAILEY, S. J. *Salmonella*. *In*: APHA (American Public Health Association). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4^o ed. Washington: APHA, Chap.37, p.357-380, 2001.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIA DE QUEIJOS (ABIQ). **Produção de queijos no Brasil**. Mensagem recebida por luesper@fea.unicamp.br em 19 Nov. 2004.
- AURELI, P.; CONSTANTINI, A.; FENICIA, L.; GIANFRANCESCHI, M.; RAINALDI, L. Ocurrance of pathogenic *Escherichia coli* in available italian soft cheese. **Archiv fur lebensmittelhygiene**, v. 43, p.17-19, 1992.
- BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase positive Coci that grow aerobically. *In*: MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8rd ed. Washington D. C.: ASM, 2003. v. 1, Chap. 28, p. 384-404.
- BATISH, V. K.; RANGANATHAN, B. Antibiotic susceptibility of deoxyribonuclease-positive *enterococci* isolated from milk and milk products and their epidemiological significance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 3, p. 31–337, 1986.

BENNET, R.W. Atypical Toxigenic *Staphylococcus* and Non-*Staphylococcus aureus* Species on the Horizon ? An Update. **Journal of Food Protection**, v. 59, nº10, p.1123-1126, 1996.

BENNETT, R. W.; BELAY, N. *Bacillus cereus*. In: APHA (American Public Health Association). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4^o ed. Washington: APHA. Chap.32, p.311-316, 2001.

BENNETT, R. W.; LANCETTE, G. A. *Staphylococcus aureus* In: UNITED STATES. Food and Drugs Administration Bacteriological Analytical Manual., 8^o ed (revisão A), 2001. Cap 12. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>. Acesso em: Jan. 2009.

BORGES, M. F. **Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo de coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência**. Campinas, 2006. 221p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

BRASIL. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de produtos de Origem Animal - RIISPOA: **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 1997.

BRASIL, Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Ap rova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária**. Brasília, 50p., 1996.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA** – Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999, que alt era o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR. Publicado no *Diário Oficial da União*: Brasília, Distrito Federal, em 22 de dezembro de 1999.

BRASIL, Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Es tabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Ministério da Saúde**. Brasília, 20p., 2004.

BRASIL, Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 200 1. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília, 18p., 2001.

BRECKING, J. C.; BERGDOLL, M. S. Outbreak of Food-borne Gastroenteritidis Due to a Coagulase-Negative Enterotoxin-Producing *Staphylococcus*. **The New England Journal of Medicin**, v. 284, nº10, p.541-543, 1971.

BRITISH COLUMBIA CENTRE FOR DISEASE CONTROL – BCCDC. **Milk safety Notes**. 28 Jun., 2002. Disponível em: <http://www.bccdc.org/content.php?item=145>. Acesso em: 26 jul., 2008.

CÂMARA, S. A. V. **Surtos de Toxinfecções Alimentares no Estado de Mato Grosso do Sul, no Período de 1998 - 001**. Escola de Saúde Pública " Dr. Jorge David Nasser", (Monografia para título de especialista), Campo Grande -MS. Campo Grande – MS, 2002.

- CAMARGO, N. J.; SOUZA, I. L.; PU Campo Grande, 2002. ZYNA, I. P.; PESTANA, A; NERVINO, C. V.; HIROOKA, E. Y. ; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação epidemiológica de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Estado do Paraná entre 1978 e 1997. *In: V Congresso Latino-Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos, Águas de Lindóia. Anais: Águas de Lindóia - SP, 1998, p.67.*
- CARIOLATO, D.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. **Food Control**, v. 19, p.886–892, 2008.
- CARMO, S. L.; DIAS, R. S.; LINARDI, R. V.; SENA, M.J.; SANTOS, A.D.; FARIA, M. E. ; PENA, E. C.; JETT, M. HENEINE, G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas Cheese and raw milk in Brazil. **Food microbiology**, nº19, p.9-14, 2002.
- CARMO, G. M. I.; OLIVEIRA, A. A.; DIMECH, C. P.; SANTOS, D. A.; ALMEIDA, M. G.; BERTO, L. H.; ALVES, R. M. S.; CARMO, E. H. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, ano 5, n. 6, p. 1-7, dez., 2005.** Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf. Acesso em: Jul., 2008.
- CARRIQUE-MAS, J. J.; HÖKEBERG, I.; ANDERSON, Y.; ARNEBORN, M.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M.-L.; OSTERMAN, B.; LEFFFLER, M.; STEEN, M.; ERIKSSON, E.; HEDIN, G.; GIESECKLE, J. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese – an outbreak of listeriosis? **Epidemiology and Infection**, London, v. 130, nº1, p. 79-86, Feb., 2003.
- CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo Minas frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas – SP.** Campinas, 2003. 107p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- CARVALHO, J. D. G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R. T.; LIMA, C. P.; VASCONCELOS, N. M.; KUAYE, A. Y. Bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 60, nº345, p. 221-224, Jul./Ago., 2005.
- CASSAROTTI, V.; GALLO, C. R.; CAMARGO, R. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas frescal comercializados em Piracicaba – SP. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 44, nº3, p. 158-163, Sept., 1994.
- CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F.; PINTO, C. L. O.; ELARD, E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 1, nº27, Jan./Mar., 2007.

- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 50, n. 26, p. 560-562, July, 2001. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5026a3.htm>. Acesso em: Dez., 2009.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Escherichia coli* Serotype O157:H7: Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic Variants. **Emerging Infectious Diseases** vol.1, n^o2, 1995. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/feng.html>. Acesso em: Dez., 2009.
- CERQUEIRA, M. M. O. P. Detecção de resíduos de antibióticos em leite – Testes disponíveis e considerações. In: BRITO, J.R.F. (Ed.) **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora – MG: Embrapa Gado de Leite, 2003. Cap. 7, p. 77-87.
- COSSÉDU, A. M.; SANTIS, E. P. L.; MAZZETTE, R.; FRESI A.; LAI, G. Ricotta bovina fresca confezionata: caratteristiche microbiologiche di interesse igienico-sanitario. **Latte**, v. 7, p.76-81, 1997.
- ÇITAK, S.; YUCEL, N.; ORHAN, S. Antibiotic resistance and incidence of Enterococcus species in turkish white cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p.27-31, 2004.
- DALTON, C. B.; AUSTIN, C. C.; SOBEL, J.; HAYES, P. S.; BIBB, W. F.; GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B.; PROCTOR, M. E.; GRIFFIN, P. M. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 336, n^o2, p. 100-105, Jan., 1997.
- DE BUYSER, M.-L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n^o1-2, p.1-17, Jan., 2001.
- DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*. In: HUI, Y.H.; PIERSON, M.D.; GORHAM, J.R. (Ed.). **Foodborne disease handbook**. 2nd ed, New York: Marcel Dekker, 2001. v. 1. Chap. 10, p. 213-246.
- DOYLE, M.P. Fecal coliforms in tea: what's problem? **Food Technology**, Back page, 1996.
- DREVIÈSE, L. A.; POT, B.; COLLINS, DAMME, L. V.; KERSTERS, K.; HAESBROUCK, F. Identification of *Enterococcus* species isolated from food of animal origins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 187-197, 1995.
- DUFRENNE, J.; SOENTORO, P.; TATINI, S.; DAY, T.; NOTERMANS, S. Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 23, p.99-109, 1994.

- DUFRENNE, J.; BIJWAARD, M.; GIFFEL, M; BEUMER, R.; NOTERMANS, S. Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 27, p.175-183, 1995.
- DUKTA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinical relevant enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p.24–27, 1995.
- DUNCAN, S. E.; YAUN, B. R.; SUMNER, S. S. Microbiological Methods for Dairy Products. In: WEHR, H. M.; FRANZ, J. F. (Eds.), **Standard Methods for Examination of Dairy Products**, 17th ed. American Public Health Association, Washington, D. C. Chapter 9, p. 249-268, 2004.
- EATON, T. J.; GASSON, M. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environment Microbiology**, v. 67, p.1628-1635, 2001.
- EGITO, A. S.; BENEVIDES, S. D.; LAGUNA, L. E.; SANTOS, K. O. Processamento de Ricota a partir do Soro de Queijos de Cabra. Sobral. **Comunicado Técnico** n°82, 2007 . Disponível em:
<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/CNPC/20867>. Acesso em Nov. 2009.
- ESPER, L. M. R. **Diagnóstico da qualidade de ricotas comercializadas no município de Campinas – SP**. Campinas, 2006. 97p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- EVANCHO, G. M.; SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; FRANK, J. F. Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment. In: Downes FP, Ito K, editors. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 rd. [S.l.]: APHA, Washington, DC; 2001, p. 25-36.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological Analytical Manual**. 8th edition. Revision A, Chapter 14, 1998.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological Analytical Manual**, Chapter 14. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-14.html> Acesso em: Dez, 2009.
- FOOD AND DRUG ASSOCIATION (FDA). **Enforcement report**, 2004. Disponível em: www.fda.gov/bbs/topics/enforce/2003/ENF00797.html. Acesso em: Set. 2008.
- FOULQUIÉ MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p.1-24, 2006.
- FOX, P. F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science**. Massachusetts: Kluwer Academic, 2000. 578p.

- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2002. 182p.
- FRANZ, C.M.A.P., HOLZAPFEL, W.H.; STILES, M.E. Enterococci at the crossroads of food safety? **International Journal of Food Microbiology**, v.47, p.1-24, 1999.
- FRANZ, C. M. A. P.; MUSCCHOLL-SILBERHORN, A.; YOUSIF, N. M. K.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; HOLZAPFEL, W. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4385-4389, 2001.
- FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p.105– 122, 2003.
- FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOEFELIN, Ch.; LUETHY, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, n^o5, p. 372-379, 1991.
- FURTADO, G.H.C.; MARTINS, S.T.; COUTINHO, A.P.; SOARES, G.M.M.; WEY, S.B.; MEDEIROS, E.A.S. Incidence of vancomycin-resistant *Enterococcus* at a university hospital in Brazil. **Revista Saúde Pública**, v. 39, p.1-5, 2005.
- GABUTTI, A. H.; DONNO, A. de; BAGORDO, F.; MONTAGNA, M. T. Comparative survival of faecal and human contaminants and use of *Staphylococcus aureus* as an effective indicator of human pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n^o8, p. 697-700, 2000.
- GAMA, B. A. **Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de *Enterococcus spp.*** Porto Alegre, 2008. 73p. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Rio grande do Sul.
- GAHAN, C. G. M.; HILL, C. A review: Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.98, n. 6, p. 1345-1353, June, 2005.
- GAULIN, C.; RAMSAY, D.; RINGUETTE, L.; ISMAIL, J. First document outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002. **Canada Communicable Disease Report**, v. 29, n^o21, Nov., 2003.
- GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, S. C.; CONDON, S.; SWINGS, J.; COGAN, T. M. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p.177-188, 2001.
- GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, S. C.; COGAN, T. M.; CONDON, S.; SWINGS, J. Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p.3560-3565, 2002.

- GIFFEL, M. C.; BEUMER, R. R.; GRANUM, P. E.; ROMBOUTS, F. M. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, v. 34, p.307-318, 1997.
- GIRAFFA, G.; CARMINATI, D., NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risk and potential technological use. **Journal of Food Protection**, v. 60, p.732-738, 1997.
- GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p.163-171, 2002.
- GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p.215– 222, 2003.
- GOMES, B. C. **Enterococos em amostras de alimentos e águas: avaliação da virulência e do desempenho como indicadores de higiene**. São Paulo, 2007. 151p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição Experimental), Universidade de São Paulo.
- GOMES, B. C.; ESTEVES, C. T.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, A. L. C.; FELIS, G. E.; SECHI, L. A.; FRANCO, B. D. G. M.; MARTINIS, E. C. P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25, p.668–675, 2008.
- GONZALEZ, A. G. M.; ROSA, A. C. P.; ANDRADE, J. R. C.; TIBANA, A. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* strains isolates from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Microbiology**, v. 17, p.321-328, 2000.
- GUELARDI, E. CELANDRONI, F., SALVETTI, S., BARSOTTI, C., BAGGIANI, A., SENESI, S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, p.129-134, 2002.
- GIFFEL, M. C.; BEUMER, R. R.; GRANUM, P. E.; ROMBOUTS, F. M. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, v. 34, p.307-318, 1997.
- GRIFFITHS, M. W. *Bacillus cereus* in liquid milk and other milk products. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n°275, p. 36-39, 1992.
- GUINEBRETIERE, M. H.; BROUSSOLE, V.; THE, C. N. Enterotoxigenic Profiles of Food-Poisoning and Food-Borne *Bacillus cereus* Strain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n°8, p.3053-3056, Aug, 2002.
- HAJIKHANI, R.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, n°2, p.105-108, 2007.

- HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxin *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n^o1, p.185-189, Jan., 2001.
- HARAGUCHI, F. K., ABREU, W. C. de, DE PAULA, H. Proteínas do soro de leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações ao esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n^o4, p. 479-488, Jul./Ago., 2006 .
- HARTMAN, P. A.; DEIBEL, R. H.; SIEVERDING, L. M. Enterococci. *In*: DOWNES, F. P.; K. ITO (eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D. C. Chapter 9, p.83-87, 2001.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's of Manual Determinative Bacteriology**, 9^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 787p.
- HÖRNER, R.; LISCANO, M. G. H.; MARASCHIN, M. M.; SALLA, A.; MENEGHETTI, B.; FORNO, N. L. F. D.; RIGHI, R. A. Susceptibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n^o6, p.391-395, 2005.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS – ICMSF. **Microorganisms in Food 5 – Characteristics of Microbial Pathogens**. Aspen Publishers, 1996.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS- ICMSF. **Microorganisms in food: Characteristics of microbial pathogens**. London: Blackie Academic & Professional, v.5. 513p., 1998.
- JAY, J. M., **Modern Food Microbiology**, 4 th ed. New York; 1992.
- JURKOVIČ, D., KRIŽKOVÁ, L., DUŠINSKÝ, R., BELICOVÁ, A., SOJKA, M., KRAJČOVIČ, J., EBRINGER, L. Identification and characterization of enterococci from Bryndza cheese. **Lett. Appl. Microbiol**, v. 42, 553–559, 2006.
- KABUKI, D.Y. **Rastreamento de Listeria monocytogenes em indústrias processadoras de queijo Minas frescal tipo latino, nos Estados Unidos da América, empregando a subtipagem molecular**. Campinas, 2004. 143p. Tese (Doutorado em alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- KAUFMANN, S. H. E.; RAUPACH, B.; FINLAY, B. B. Introduction: microbiology and immunology: lessons learned from *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v. 3, n^o14/15, p. 1177-1181, Nov./Dec., 2001.
- KAYSER, F. H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **International Journal Food Microbiology**, v.88, p.255-262, 2003.

- KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: .APHA (American Public Health Association). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4^o ed. Washington: APHA, 2001. Chap.8, p.69-82.
- KOSIKOWSKI, F.V.; MISTRY, V.V. Soft Italian Cheese-Mozzarella and Ricotta. **Cheese and Fermented Milk Foods**: Volume I: Origins and Principles. 3^{ed}. Virginia: F.V. Kosikowski, L.L.C, v.1, cap.11, p.174-179, 1999.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 2, n^o1, p. 63-76, Jan., 2003.
- LEITÃO, M. F. F. Microbiologia de Alimentos. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L (ed). **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Manole, v. 2, 1988.
- LI, F. C.; CHENG, C. C. Growth and enterotoxins production by a coagulase-negative *Staphylococcus* strains *Staphylococcus warneri* CCRC 12929 and *S. haemolyticus* CCRC 12923 in cow milk and goat milk. **Food Science**, v. 24, n^o1, p.120-128, 1997.
- LIN, S.; SCHRAFT, H.; ODUMERU, J. A.; GRIFFITHS, M. W. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, n^o43, p.159-171, 1998.
- LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; LOU, X. D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C.; HIRD, D. W.; YONEKURS, M. L.; HAYES, P.; WEAVER, R.; AUDURIER, A.; PLIKATIS, B. D.; FANNIN, S. L.; KLELS, A.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis associated with Mexicanstyle cheese. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 319, n^o13, p.823-828, Sept., 1988.
- LONCAREVIC, S.; BILLE, E. B. J.; THAM, M. L. D.; THAM, W. Characterization of *Listeria* strains isolated from soft and semi-soft cheeses. **Food microbiology**, v. 15, p. 521-525, 1998.
- LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, n^o6, p.1063-1067, 2001.
- LUND, T.; GRANUM, P. E. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxina complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. **FEMS Microbiology Letters**, v. 141, n^o2-3, p.151-156, Aug., 1996.
- MANNU, L.; PABA, A.; DAGA, E.; COMUNIAN, R.; ZANETTI, S.; DUPRE, I.; SECHI, L. A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 291-304, 2003.
- MARTINS VIEIRA, M.B.C.; DIAS, R. S. ; SOUZA, J .M.; SILVA, MC.C.; SILVA . S. O.; FERNANDES, S. H. Evolução dos Surtos de toxinfecção alimentares no estado de Minas Gerais, no período de agosto de 1991 a agosto de 1998 . In: V Congresso Latino -

- Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos, 11, 1998, Águas de Lindóia **Anais. Águas de Lindóia - SP: 1998, p. 71.**
- MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. 1999. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infection Disease**, Atlanta, v. 5, n^o5, p. 607–625, Sep./Oct., 1999.
- MENDES, R. A.; AZEREDO, R. M. C.; COELHO, A. I. M; OLIVEIRA, S. S.; COELHO, M. S. L. Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 2, n^o17, p. 255-261, Abr./Jun., 2004 .
- MENÉNDEZ, S.;GODÍNEZ, R.;CENTENO, J. A.; OTERO-RODRÍGUEZ, J. L. Microbiological, chemical and biochemical characteristics of “Tetilla “raw cows-milk cheese. **Food microbiology**, v. 18, p. 151-158, 2001.
- MODLER, H. W.; EMMONS, D. B. The use of continuous ricotta processing to reduce ingredient cost in further processes cheese products. **International Dairy Journal**, n^o11, p.517-523, 2001.
- MORANDI, S.; BRASCA, M.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A.; LODI, R. Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from Northwest Italian dairy products. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 867-875, 2006.
- MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 513-522, 2000.
- MURRAY, B.E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology**, v.3, p.46-65, 1990.
- MURRAY, P. R.; TORROS, E. F. **Microbiologia Médica**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.220-223, 2004.
- NASCIMENTO, M. S. **Efeito inibitório de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* ALC 01, *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 e *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* ATCC 11454 sobre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus***. Campinas, 2007. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimento) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- NCCLS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. Fifteenth informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.
- NORMANO, G.; FIRINU, A.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DESCATELLI, L.; IONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; GIANNATALE, E. D.; SALINETTI, A. P.; SALANDRA, G. L.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N. C.; CELANO, G. V. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, n^o98, p.73-79, 2005.

NOTERMANS, S.; BATT, C. A. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, Oxford, v. 84, nº1, p. 51-61, Oct., 1998.

ODOMERU, J. A.; TONER, A. K.; MUCKLE, C. A.; GRIFFITHS, M. W.; LYNCH, J. A. Detection of *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin in raw and pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 30, nº11, p. 1391-1393, 1997.

OLIVEIRA, A. M. **Investigação do comportamento de estafilococos enterotoxigênicos coagulase negativos em alimentos**. Campinas, 1999.102p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food environmental samples. In: CANADA. Health Products Food Branch. **Compendium of analytical methods: laboratory procedures of microbiological analytical of foods**, [MFHPB 30] Ottawa, 2001.

PENG, J. S; TSAI; CHOU, C. C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 77, nº1-2, p. 11-18, July, 2001.

PEREIRA, M. L. **Estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas e relato de um surto por espécie coagulase positiva**. Campinas, 1996. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

PEREIRA, K. S.; PEREIRA, J. L. Estafilococos coagulase negativa: Potenciais patógenos em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, nº129, p.32-34, 2005.

PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W. T.; FALEIRO, E. S. C. Avaliação de ensaios analíticos para detecção de coliformes fecais em queijos Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, nº5, Belo Horizonte, 1999.

PEREIRA, K. C.; SÁ, O. R.; PERIERA, K. C. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do queijo canastra e de sua matéria prima produzidos na região de São Roque de Minas (MG). **Scientiae et Praxis**, v. 1, nº2, 2008.

PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C de; LIMA S. I. de; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S de; LIMA, M. de. Queijo Minas tipo frescal artesanal e industrial. Qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes microbianos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, nº83, p.63-70, Abr., 2001.

PINTO, B.; PIEROTTI, R.; CANALE, G.; REALI, D. Characterization of 'faecal streptococci' as indicators of faecal pollution and distribution in the environment. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 258-263, 1999.

- RAIMUNDO, I. C. **Avaliação microbiológica de amostras de ricotas comercializadas no município de Alfenas**. Lavras, 2004. 36p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras.
- RAJKOWSKI K.T.; BENNETT, R.W. *Bacillus cereus*, in **International Handbook of Foodborne Pathogens**. Chapter 3. Eds Miliots M.D., Bier J.W. New York, Marcel Dekker, 2003, 27-40.
- REZENDE-LAGO, N. C. M.; ROSSI JR, O. D.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; AMARAL, L. A. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, n°6, Belo Horizonte, MG; Dez., 2007.
- RIBEIRO, A. C.; MARQUES, S. C.; SODRÉ, A. F.; ABREU, L. R.; PICCOLI, R. H. Controle microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n°1, Lavras, Jan./Fev., 2005.
- RIBEIRO, T.; ABRANTES, M.; LOPES, M. F.; CRESPO, M. T. Vancomycin susceptible dairy and clinical enterococcal isolates carry *vanA* and *vanB* genes. **International Journal of Food Microbiology**. v. 113, p.289-295, 2007.
- RIBOLDI, G. P. **Perfil de resistência antimicrobiana e análise genotípica de *Enterococcus* spp. isolados de alimentos em Porto Alegre, RS**. Porto Alegre, 2007. 125p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- ROCHA, J. A. K. **Estudo da presença de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* em indústria processadora de queijo Minas frescal**. Campinas, 2004. 77p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- ROSADO, M. S. **Biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável: caracterização tecnológica, modelagem e controle por agentes sanitizantes**. Campinas, 2009. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis and food safety**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1999. 738p.
- SABIA, C.; NIEDERHÄUSERN, S.; GUERRIERI, E.; MESSI, P.; ANACARSO, I.; MANICARDI, G.; BONDI, M. Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 970–979, 2008.
- SÃO PAULO. Dados de surtos de DTA notificados por DIR e municípios em 2002. **Centro de Vigilância epidemiológica**. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/Surtos_DTA02.ppt. Acesso em: agosto 2009.
- SANCHEZ, C. P. P. **Ocorrência de *Bacillus cereus*, avaliação de sua resistência térmica em sistema contínuo e seu controle em leite UHT**. Campinas, 2005. 255 p.

- Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SANCHEZ, G. N.; RODRIGUES, R.M.; OLVERA, P.R.; GARZA, L. M. Development of two Multiplex Polymerase chain reaction for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection**, v. 66, n°6, p.1055-1062, 2002.
- SANTOS, B. H. C.; SOUZA, E. L.; ODDI, I. C. Presença de *Enterococcus* sp. E alimento enteral e perfil de resistência a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 36, p. 47-49, 2004.
- SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. L. *Bacillus cereus* Food Poisoning and its Toxins. **Journal of Food Protection**, v. 68, n°3, p.636-648, 2005.
- SEDGLEY, C. M.; MOLANDER, A.; FLANNAGAN, S. E.; NAGEL, A. C.; APPELBE, O. K.; CLEWELL, D. B.; DAHLE, G. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. **Oral Microbiology Immunology**, v. 20, p. 10–19, 2005.
- SHARIF, F. A.; ALAEDDINOGLU, G. A. Rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, p. 227-229, 1998.
- 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.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. p.552.
- SIQUEIRA, I. M. C.; SOUXA, M. R.; CERQUEIRA, M. M.; GLORIA, M. B. A. Importância e utilização dos derivados de soro de queijo. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 16, n°97, p.31-35, 2002.
- SLADE, P. J. Monitoring *Listeria* in the food production environment - Identification techniques. **Food Research International**, Ottawa, v. 25, n. 3, p. 203-214, May/June, 1992.
- SOARES, C. M. ***Bacillus cereus* produtores de toxinas diarréicas em serviços de alimentação: análise da contaminação ambiental e detecção na linha de processamento de pratos cárneos**. Campinas, 2004. 134p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SORIANO, J. M.; FRONT, G.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 13, n°2, p. 60-67, Feb., 2002.

- SOUZA, M. R.; MORAIS, C. F. A.; CORRÊA, C. E. S.; RODRIGUES, R. Características físico-químicas de queijos comercializados em Belo Horizonte, MG. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 14, n°73, p.68-71, 2000.
- SOUZA, R. S.; PORTO, E. **Qualidade microbiológica da ricota comercializada no mercado de Piracicaba**. In: 14° Simpósio de Iniciação Científica da USP, Piracicaba, 2006.
- STADHOUDERS, J. Taxonomy of *Bacillus cereus*. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, s/v, n°275, p. 4-8, July, 1992.
- SUZZI G, CARUSO M, GARDINI F, LOMBARDINI A, VANNINI L, GUERZONI M E, ANDRIGHETTO C AND LANORTE M T. A survey of enterococci isolated from artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 267-274, 2000.
- SVENSSON, B.; ENEROTH, A.; BRENDENHAUG, J.; CHRISTIANSSON, A. Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. **International Journal of Dairy Journal**, v. 9, n°12, p.903-912, 1999.
- SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. 2nd ed., Washington D. C.: ASM, 2001. Chap. 18, p. 383-409.
- TEIXEIRA, L. V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D. A. A. Leite de Búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n°2, p. 96 – 100, Belo Horizonte, 2005.
- TEMELLI, S.; ANAR, S.; SEN, C.; AKYUVA, P. Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. **Food Control**, v. 17, p. 856-861, 2006.
- TOMPIKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food- processing environment. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n°4, p.709-725, Apr.,2002.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Disponível em: www.eng.ufsc.br/labs/probio/disc.../tipos.htm, Acesso em: Nov. 2009.
- VANCANNEYT, M.; LOMBARDI, A.; ANDRIGHETTO, C.; KNIJFF, E.; TORRIANI, S.; BJORKROTH, K. J.; FRANZ, C. M. A. P.; MORENO, M. R. F.; REVETS, H.; VUYST, L. D.; SWINGS, J.; KERSTERS, K.; DELLAGLIO F.; HOLZAPPEL, W. H. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n°3, p.1381-1391, 2002.
- VERAS, J. F.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; FERNANDES, T. M. G.; AZALIM, C. C.; SILVA, M. C. C.; MARTINS, R. T.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n°104/105, p. 218-119, Jan./Fev., 2003.

VIANNI, M. C. E.; LÁZARO, N. S. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em amostras de cocos Gram-positivos, catalase negativos, isoladas de mastite subclínica bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, nº2, Rio de Janeiro, 2003.

WATANUKI M. M. **Detecção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação de seus esporos à temperatura ambiente e sob refrigeração após processo de fervura**. Dissertação (Mestre em Ciência) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2008.

WESSELS, D.; JOOSTE, P. J.; MOSTERT, J. F. The prevalence of *Enterococcus* species in milk and dairy products. **South African Journal of Dairy Science**, v. 20, p. 68–72, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, **Press Release**, nº58, Aug., 1997. Disponível em <http://www.who.int/archives/inf-pr-1997/en/pr97-58.html>. Acesso em: Jul., 2008.

APÊNDICE A

A1: Descrição das etapas de processamento de ricota

O processamento da ricota envolve as seguintes etapas:

Recepção do leite

O leite é recepcionado em plataforma a partir das 8 horas da manhã e chega em caminhões tanques ou em latões de plástico com capacidade de 50L transportados por caminhões.

Diariamente são realizadas as análises de leite: índice de crioscopia, acidez, densidade, gordura e extrato seco desengordurado (ESD).

Mensalmente são enviadas amostras de leite para laboratório credenciado pelo Ministério da Agricultura onde são realizadas as análises: contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT) e composição (gordura, proteína, lactose, Extrato seco total e ESD).

As temperaturas do leite cru que chegam nos latões e no caminhão tanque são de aproximadamente 18 e 12°C, respectivamente; sendo que todo o leite que chega é recepcionado em um tanque (**Fig. 10**). Os recipientes vazios, são lavados em máquinas (**Fig. 11**) apenas com água quente e vapor.



Figura 10. Tanque de recepção do leite.



Figura 11. Máquina de lavagem dos recipientes.

Pasteurização do leite

É realizada a pasteurização rápida, em trocador de calor a placas (**Fig. 12**), a 74,5°C por 15 a 20 segundos.



Figura 12. Trocador de calor a placas.

Fabricação de queijo

Depois de pasteurizado, o leite segue para tanques de aço inoxidável com capacidade de 1500L onde são processados os diferentes tipos de queijo. Na indústria de laticínios avaliada no nosso estudo, cada tipo de queijo atinge uma determinada temperatura, como mostra a tabela abaixo.

Tabela 28. Condições de temperaturas utilizadas nos diferentes processamentos de queijos

Tipo de queijo	Temperatura (°C)
Minas frescal	41
Mussarela	43 – 44
Prato	43
Araxá	39
Minas Padrão	42
Coalho	49 – 50

Fonte: Indústria de laticínios, 2009.

Soro de queijo

Todo o soro proveniente da fabricação dos queijos é transferido para tanques de recepção de soro através de bombas de transferência como mostra a **Figura 13**. O excesso do soro dos queijos que já foram enformados é coletado em caixas (**Fig. 14**) e levados para o mesmo tanque. Este tanque é de aço inoxidável com capacidade de 1500L. A temperatura do soro neste momento está em torno de 39-40°C, dependendo do tipo de queijo que está sendo fabricado. O soro de todos os queijos é transferido para o mesmo tanque.



Figura 13. Tanque de recepção do soro com a bomba de transferência de soro.



Figura 14. Caixa de recolhimento do soro.

Descrição do Processamento da ricota

O soro de queijo chega ao tanque de processamento a uma temperatura aproximada de 33°C. Este soro deve ser fresco e deve estar com acidez em torno de 7°Dornic. Soros mais ácidos podem precipitar precocemente, e com isso haver uma diminuição do rendimento, além de prejudicar a consistência do produto ficando mais mole.

Opcionalmente, reduz-se a acidez do soro para 6-8 °D com bicarbonato de sódio a partir da seguinte fórmula:

$$\text{g bicarbonato} = \text{vol. soro} \times \text{°D a reduzir} \times 0,0933$$

Com isso, evita-se a precipitação precoce do soro antes de atingir a temperatura final de aquecimento e auxilia a ascensão dos flocos de proteína após a adição do agente acidificante.

O soro é aquecido no tanque com vapor direto até uma temperatura aproximada de 70°C. Este vapor vem de uma caldeira onde é filtrado antes de entrar em contato com o produto.

Neste momento, adiciona-se leite pasteurizado (20%) a fim de melhorar o rendimento do produto e o corante de clorofila que tem a finalidade de retirar a cor proveniente dos soros dos queijos amarelos; o aquecimento com vapor continua até a temperatura de 90°C (**Fig. 15**). Adiciona-se o agente acidificante, cloreto de cálcio que promove a precipitação das proteínas do soro e logo após adiciona-se o cloreto de sódio. Após a acidificação, o aquecimento é mantido até atingir a temperatura aproximada de 93°C para que ocorra uma melhor precipitação e ascensão das proteínas. O aquecimento é interrompido neste momento.



Figura 15. Aquecimento do produto com vapor direto.

A espuma formada é retirada com jatos de água e jogada para o chão como mostra a **Figura 16**.



Figura 16. Retirada da espuma com jatos de água.

A ricota é enformada em formas de acrílico com capacidade de 600g e através da prensa pneumática é retirado o excesso de soro (**Fig. 17**). As formas variam de acordo com o peso, o formato e o tipo de ricota que se deseja. Geralmente, para ricota fresca utiliza-se formas de queijo Minas frescal.



Figura 17. Enformagem da ricota.

Esta ricota fica a temperatura ambiente por aproximadamente 5 horas para que ocorra seu resfriamento e após é colocada na câmara fria onde fica a uma temperatura de 4 – 7°C até o dia seguinte.

Após 24 horas do processamento, a ricota é embalada em embalagens plásticas através de uma máquina seladora a vácuo. A data de fabricação é carimbada na embalagem, na qual é descrita a validade de 60 dias. São armazenadas posteriormente na câmara fria para distribuição. A distribuição é realizada em caminhões refrigerados (4 – 7 °C) da própria empresa.

O abastecimento de água é feito por um poço artesiano profundo o qual é tratado com 12% de cloro ativo, com água ---- na concentração de 1-3 mg/L de cloro residual livre.

A indústria possui laboratórios de análise físico-química e microbiológica, e semestralmente realiza as análises exigidas pela RDC nº 12/2001 - ANVISA, através de serviço terceirizado.

Higienização de equipamentos, utensílios e instalações

De acordo com a indústria de laticínios avaliada no nosso estudo, a limpeza dos equipamentos, utensílios e instalações é realizada conforme ilustra a **Tabela 29**.

As formas, telinhas e prensas são fervidas, após são lavadas com detergente neutro, enxaguadas e colocadas em água clorada.

Os utensílios como mexedor, pote e pá que recolhem os grumos de ricota, peneira ficam de molho de um dia para o outro na água clorada na concentração de 2 mg/L de cloro residual livre.

Tabela 29. Relação dos produtos de higienização utilizados na indústria de laticínios

Produto	Composição	Finalidade	Concentração utilizada
SANDET 142	Ácido Mineral, tensoativo não iônico e coadjuvantes	Limpeza de pisos e azulejos	10% (1l do produto para 10L de H ₂ O)
SANDET 491 (neutro)	Ácido Linear alquilbenzeno Sulfônico	Limpeza de equipamentos e utensílios	3% (1,5l de produto para 50l de H ₂ O)
SANDET 741 (sabão em pó)	Tensoativo iônico, não iônico, seqüestrante e mistura de sais alcalinos	Limpeza de latões de leite, equipamentos, utensílios, paredes, pisos	5% (1 kg do produto para 20L de H ₂ O)
MUND HANDCLEAN	Tensoativo aniônico, Irgasan DP 300 e espessante	Limpeza e desinfecção das mãos	Puro
MUND QTA	Quartenário de Amônio	Tapete Sanitizante	2% (1l de produto para 50l de H ₂ O)

Continuação...

NIPPO FRIGO DELTA	Detergente Desincrustante alcalino	Remoção de gorduras e oleosidades em equipamentos, paredes, pisos.	4% (1,5l de produto para 40l de solução)
SANDET 874	Desincrustante Alcalino	Limpeza CIP (Pasteurizador)	1% (3l de produto para 300l de H ₂ O)
SANDET 162	Ácido	Limpeza CIP (Pasteurizador)	1% (3l de produto para 300l de H ₂ O)

Fonte: Indústria de laticínios, 2009.

A2: Layout da indústria processadora de ricota

O *layout* da indústria de laticínios está ilustrado na **Figura 18**. Nele consegue-se observar as áreas de processamento e os equipamentos utilizados para a fabricação da ricota.

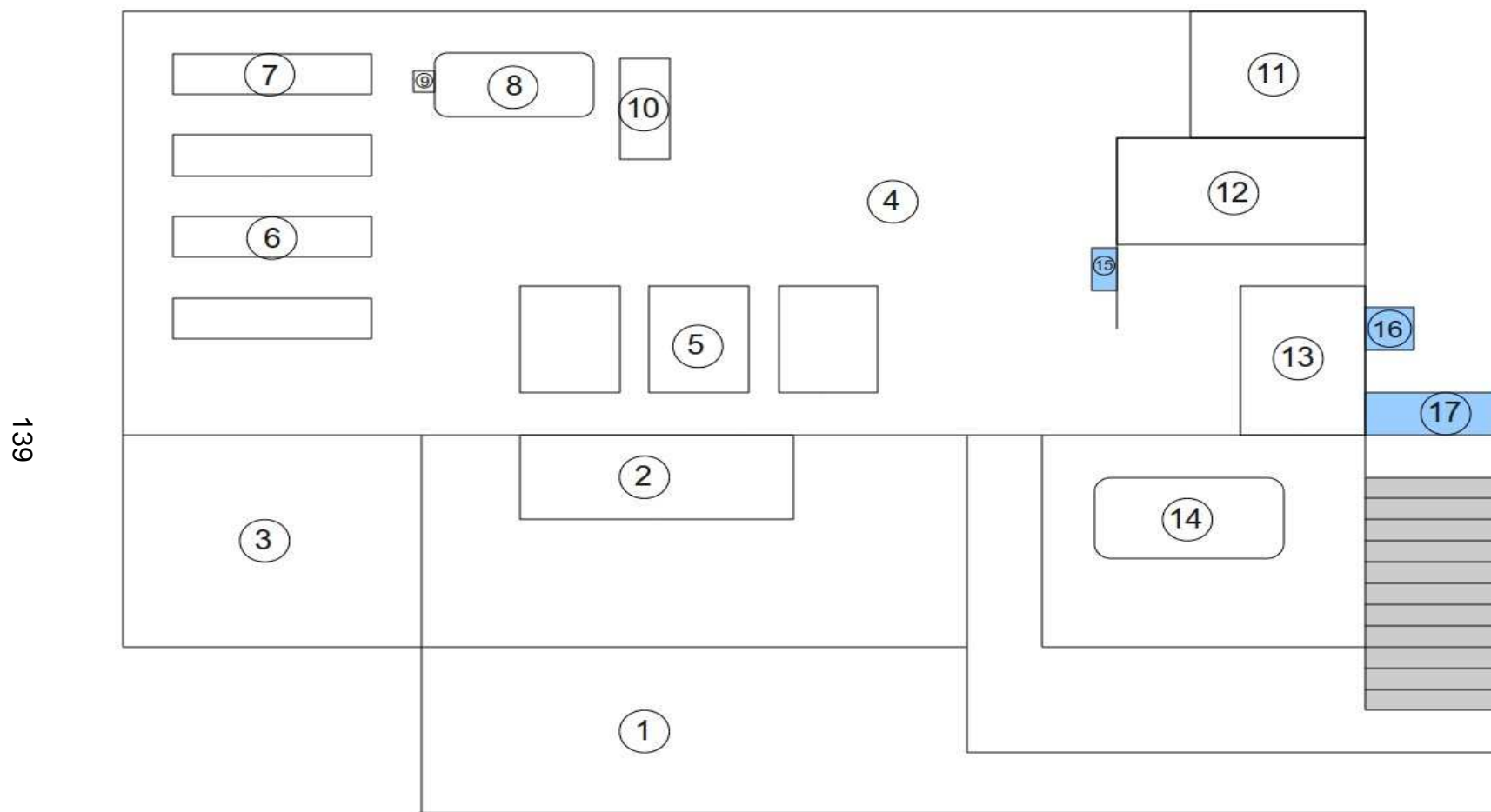


Figura 18. Layout da indústria processadora de ricota.

Legenda:

- 1 – Plataforma de recepção do leite
- 2 – Tanque de recepção do leite
- 3 – Sala do pasteurizador
- 4 – Área de processamento
- 5 – Tanques de processamento de queijo Minas frescal
- 6 – Tanques de recepção de soro de queijo
- 7 – Tanques de processamento de ricota
- 8 – Bancada de enformagem da ricota
- 9 – Ralo de esgotamento do soro de queijo
- 10 – Prensa pneumática
- 11 – Câmara fria 1
- 12 – Câmara fria 2
- 13 – Câmara fria 3
- 14 – Bancada de embalagem da ricota
- 15 – Pia 1: Lavagem e assepsia das mãos
- 16 – Pia 2: Lavagem e assepsia das mãos antes da entrada na fábrica
- 17 – Pé de lúvio - Lavagem das botas

APÊNDICE B

B1: Provas bioquímicas para a confirmação do gênero *Bacillus* e identificação da espécie de *Bacillus cereus*.

Tabela B1. Provas bioquímicas para a confirmação do gênero *Bacillus* e identificação da espécie de *Bacillus cereus* em amostras de matéria prima, amostras ambientais, ar ambiente e ricota referentes à 1ª coleta

Amostra	Manitol	Lecitinase	Catalase	Gram	Glicose	Tirosina	VP	Nitrato	Cristais de toxina	Motilidade	Rizóide	Hemolítica
LP1 (1)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
LP1 (2)	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
LP1 (3)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
LP1 (4)	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
LP1 (5)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
S1 (1)	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
S1 (2)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
S1 (3)	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
S1 (5)	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
S3 (1)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
S3 (2)	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
RA2 (1)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
RA2 (2)	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
RA2 (3)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA2 (4)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA2 (5)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA3 (1)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA3 (2)	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
RA3 (3)	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
RA3 (4)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA3 (5)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA4 (1)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA4 (2)	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
RA4 (3)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA4 (4)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA4 (5)	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
10 (1)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+

Continuação...

10 (2)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
10 (3)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
10 (4)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
10 (5)	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
19 (1)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
19 (2)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
20 (1)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
20 (2)	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
20 (3)	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
20 (4)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
20 (5)	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
21 (1)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
21 (2)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
21 (3)	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
21 (4)	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
21 (5)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RF2 (1)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RF2 (2)	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
RF2 (3)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RF2 (4)	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
RF2 (5)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+

LP: Leite Pasteurizado; S: Soro de queijo; RA: Ricota antes de embalada; 3: Tanque de processamento da ricota; 10: Forma da ricota 19: Bancada 2 – embalagem; 20: Caixa de armazenamento; 21: Ralo de esgotamento do soro; RF: Ricota depois de embalada. As amostras em negrito não foram confirmadas para a espécie *B. cereus*.

Tabela B2. Provas bioquímicas para a confirmação do gênero *Bacillus* e identificação da espécie de *Bacillus cereus* em amostras de matéria prima, amostras ambientais e ricota referentes à 2ª coleta

Amostra	Manitol	Lecitinase	Catalase	Gram	Glicose	Tirosina	VP	Nitrato	Cristais de toxina	Motilidade	Rizóide	Hemolítica
S5 (1)	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
RA8 (1)	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
RA8 (2)	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
RA8 (3)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA8 (4)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA10 (1)	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
RA10 (2)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
32 (1)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
33 (1)	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
33 (2)	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
33 (3)	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
33 (4)	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
33 (5)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
38 (1)	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
42 (1)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
42 (2)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
42 (3)	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
42 (4)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
42 (5)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
e1 (1)	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
e2 (1)	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
e3 (1)	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+

S: Soro de queijo; RA: Ricota antes de embalada; 32: Forma da ricota; 33: Prensa da ricota; 38: Parede; 42: Ralo de esgotamento do soro; e: ar ambiente da sala de produção. As amostras em negrito não foram confirmadas para a espécie *B. cereus*.

Tabela B3. Provas bioquímicas para a confirmação do gênero *Bacillus* e identificação da espécie de *Bacillus cereus* em amostras de matéria prima, amostras ambientais e ricota referentes à 3ª coleta

Amostra	Manitol	Lecitinase	Catalase	Gram	Glicose	Tirosina	VP	Nitrato	Cristais de toxina	Motilidade	Rizóide	Hemolítica
LC3 (1)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
LC3 (2)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
LC3 (3)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
LC3 (4)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
LC3 (5)	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
RA11 (1)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA11 (3)	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
RA11 (4)	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
RA11 (5)	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
RA12 (1)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA12 (2)	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
RA12 (3)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA12 (4)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA12 (5)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA15 (1)	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
RA15 (2)	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
RA15 (3)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
RA15 (4)	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
RA15 (5)	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
50 (1)	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
50 (2)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
50 (3)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
50 (4)	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
50 (5)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
51 (1)	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
51 (2)	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
51 (3)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
51 (4)	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
60 (1)	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
60 (2)	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+

LC: Leite Cru; RA: Ricota antes de embalada; 50: Forma da ricota; 60: Ralo de esgotamento do soro. As amostras em negrito não foram confirmadas para a espécie *Bacillus cereus*. As amostras em negrito não foram confirmadas para a espécie *B. cereus*.

APÊNDICE C

C1: Provas bioquímicas para a confirmação do gênero *Enterococcus* e identificação das espécies de *E. faecium* e *E. faecalis* através da técnica de PCR.

Tabela C1. Provas bioquímicas para confirmação do gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR das amostras de matéria prima, amostras ambientais, ar ambiente e ricota referentes à 1ª coleta

Amostra	Gram	Catalase	6,5% NaCl	pH 9,6	BHI 10°C	BHI 45°C	Bile-esculina	PCR <i>E. faecium</i>	PCR <i>E. faecalis</i>
LC1 (1)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
LC1 (2)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
LC1 (3)	+	-	+	+	+	+	+	+	
LC1 (4)	+	-	+	+	+	+	+	+	
LC1 (5)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
LP1 (1)	+	-	-	-	-	+	-		
LP1 (2)	+	-	-	-	-	+	-		
LP1 (3)	+	-	-	-	-	+	-		
LP1 (4)	+	-	-	-	-	+	+		
LP1 (5)	+	-	-	-	-	+	-		
S1 (1)	+	-	-	-	-	+	-		
S1 (2)	+	-	-	-	-	+	-		
S1 (3)	+	-	-	-	-	+	-		
S1 (4)	+	-	-	-	-	+	-		
S1 (5)	+	-	-	-	-	+	-		
S3 (1)	+	-	-	+	-	+	-		
S3 (2)	+	-	-	-	-	+	-		
S3 (3)	+	-	-	-	-	+	-		
S3 (4)	+	-	-	-	-	+	-		
S3 (5)	+	-	-	-	-	+	-		
3 (1)	+	-	+	+	+	+	+		+
3 (2)	+	-	+	+	+	+	+		+
3 (3)	+	-	+	+	+	+	+		
3 (4)	+	-	+	+	+	+	+		+
3 (5)	+	-	+	+	+	+	+		+
10 (1)	+	-	+	+	+	+	+	+	
10 (2)	+	-	-	-	-	+	-		
10 (3)	+	-	-	-	-	+	-		
10 (4)	+	-	-	-	-	+	-		
10 (5)	+	-	+	+	-	+	-		
17 (1)	+	-	+	+	-	+	-		
17 (2)	+	-	+	+	+	+	+	+	
17 (3)	+	-	+	+	+	+	+	+	
17 (4)	+	-	+	+	+	+	+	+	
17 (5)	+	-	+	+	-	+	-		
21 (1)	+	-	+	+	+	+	+		
21 (2)	+	-	+	+	+	+	+		
21 (3)	+	-	+	+	+	+	+		
21 (4)	+	-	+	+	+	+	+		
21 (5)	+	-	+	+	+	+	+	+	

Continuação...

<i>T1 (1)</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	
T1 (2)	+	-	+	+	+	+	+		
T1 (3)	+	-	-	-	-	+	-		
T1 (4)	+	-	+	-	-	+	-		
T1 (5)	+	-	-	-	-	+	-		
V1 (1)	+	-	+	+	+	+	+		+
V1 (2)	+	-	+	+	+	+	+		+
V1 (3)	+	-	+	+	+	+	+		
V1 (4)	+	-	+	+	+	+	+		
V1 (5)	+	-	+	+	+	+	+		+
a1 (1)	+	-	+	+	+	+	+		+
a1 (2)	+	-	-	+	-	+	+		
a1 (3)	+	-	-	-	-	+	-		-
a1 (4)	+	-	+	+	+	+	+		
d (1)	+	-	-	-	-	+	-		
d (2)	+	-	-	+	+	+	-		
d (3)	+	-	-	-	-	+	-		
RA1 (1)	+	-	+	+	+	+	+		+
RA1 (2)	+	-	+	+	+	+	+		+
RA1 (3)	+	-	+	-	-	+	-		
RA1 (4)	+	-	+	-	-	+	-		
RA1 (5)	+	-	-	-	-	+	-		
RF1 (1)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF1 (2)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF1 (3)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF1 (4)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF1 (5)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF2 (1)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF2 (2)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF2 (3)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF2 (4)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF2 (5)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF3 (1)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF3 (2)	+	-	+	+	+	+	+		-
RF3 (3)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF3 (4)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF3 (5)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF4 (1)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF4 (2)	+	-	+	+	+	+	+		-
RF4 (3)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF4 (4)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF4 (5)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF5 (1)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF5 (2)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF5 (3)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF5 (4)	+	-	+	+	+	+	+		+
RF5 (5)	+	-	+	+	+	+	+		+

LC: Leite Cru; LP: Leite Pasteurizado; 3: Tanque de processamento da ricota; 10: Forma da ricota
 17: Parede; 21: Ralo de esgotamento do soro; T: Tela de retenção; V: Vassoura; a: ar ambiente da
 sala de produção; d: ar ambiente da sala de embalagem; RA: Ricota antes de embalada; RF:
 Ricota depois de embalada.

Tabela C2. Provas bioquímicas para confirmação do gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR das amostras de matéria prima, amostras ambientais, ar ambiente e ricota referentes à 2ª coleta

Amostra	Gram	Catalase	6,5% NaCl	pH 9,6	BHI 10°C	BHI 45°C	Bile-esculina	PCR <i>E. faecium</i>	PCR <i>E. faecalis</i>
LC2 (1)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
LC2 (2)	+	-	+	+	+	+	+	+	
LC2 (3)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
LC2 (4)	+	-	+	+	+	+	+	+	
LC2 (5)	+	-	+	+	+	+	+		+
39 (1)	+	-	+	+	+	+	+	+	
39 (2)	+	-	+	+	+	+	+	+	
39 (3)	+	-	+	+	+	+	+	+	
39 (4)	+	-	+	+	+	+	+	+	
39 (5)	+	-	+	+	+	+	+	+	
V2 (1)	+	-	-	-	-	+	-		
V2 (2)	+	-	-	-	-	+	-		
V2 (3)	+	-	-	-	-	+	-		
V2 (4)	+	-	+	-	-	+	-		
V2 (5)	+	-	-	-	-	+	-		
e2 (1)	+	-	+	+	+	+	+	-	-
e2 (2)	+	-	+	+	+	+	+	+	-
RA6 (1)	+	-	-	-	-	+	-		
RA6 (2)	+	-	-	-	-	+	-		
RA6 (3)	+	-	-	-	-	+	-		
RA6 (4)	+	-	-	-	-	+	-		
RA6 (5)	+	-	-	-	-	+	-		
RF6 (1)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF6 (2)	+	-	-	+	-	+	+		
RF6 (3)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF6 (4)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF6 (5)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF7 (1)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF7 (2)	+	-	-	+	-	+	+		
RF7 (3)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF7 (4)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF7 (5)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF8 (1)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF8 (2)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF8 (3)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF8 (4)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF8 (5)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF9 (1)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF9 (2)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF9 (3)	+	-	-	+	-	+	+		
RF9 (4)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF9 (5)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF10 (1)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF10 (2)	+	-	+	+	+	+	+	+	

Continuação...

<i>RF10 (3)</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
RF10 (4)	+	-	+	+	+	+	+	+
RF10 (5)	+	-	+	+	+	+	+	+

LC: Leite Cru; 39: Bancada 1 – processamento da ricota; V: Vassoura; e: ar ambiente da sala de produção; RA: Ricota antes de embalada; RF: Ricota depois de embalada.

Tabela C3. Testes presuntivos para confirmação do gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR das amostras de matéria prima, amostras ambientais, ar ambiente e ricota referentes à 3ª coleta

Amostra	Gram	Catalase	6,5% NaCl	pH 9,6	BHI 10°C	BHI 45°C	Bile-esculina	PCR <i>E. faecium</i>	PCR <i>E. faecalis</i>
LC3 (1)	+	-	+	+	+	+	+	+	
LC3 (2)	+	-	+	+	+	+	+		
LC3 (3)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
LC3 (4)	+	-	+	+	+	+	+	+	
LC3 (5)	+	-	+	+	+	+	+	+	
S7 (1)	+	-	+	+	+	+	+	+	
S7 (2)	+	-	-	+	-	+	+		
S7 (3)	+	-	-	-	-	+	-		
S7 (4)	+	-	+	-	-	+	-		
S7 (5)	+	-	-	+	-	+	-		
S8 (1)	+	-	+	+	+	+	+	+	
S8 (2)	+	-	+	+	-	+	-		
S8 (3)	+	-	-	-	-	+	-		
S8 (4)	+	-	+	+	-	+	-		
S8 (5)	+	-	-	-	-	+	-		
46 (1)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
46 (2)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
46 (3)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
46 (4)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
46 (5)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
47 (1)	+	-	-	+	-	+	+		
47 (2)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
47 (3)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
47 (4)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
47 (5)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
50 (1)	+	-	+	+	+	+	+	+	
50 (2)	+	-	+	+	+	+	+	+	
50 (3)	+	-	-	-	-	+	-		
50 (4)	+	-	+	+	+	+	+	+	
50 (5)	+	-	+	+	+	+	+	+	
56 (1)	+	-	+	+	+	+	+	-	-
56 (2)	+	-	+	+	+	+	+	+	
56 (3)	+	-	+	+	+	+	+	-	-
56 (4)	+	-	+	+	+	+	+	-	-
56 (5)	+	-	+	+	+	+	+	+	
57 (1)	+	-	-	-	-	+	-		
57 (2)	+	-	-	-	-	+	-		
57 (3)	+	-	-	-	-	+	-		
57 (4)	+	-	-	-	+	+	-		
57 (5)	+	-	-	-	+	+	-		
58 (1)	+	-	+	+	+	+	+	-	-

Continuação...

58 (2)	+	-	+	+	+	+	+	-	-
58 (3)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
58 (4)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
58 (5)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
60 (1)	+	-	+	+	+	+	+		
60 (2)	+	-	+	+	+	+	+		
60 (3)	+	-	+	+	+	+	+		
60 (4)	+	-	+	+	+	+	+		
60 (5)	+	-	+	+	+	+	+		
T3 (1)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
T3 (2)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
T3 (3)	+	-	+	+	+	+	-		
T3 (4)	+	-	-	+	-	+	+		
T3 (5)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
RA11 (1)	+	-	-	-	-	+	-		
RA11 (2)	+	+	+	+	-	+	+		
RA11 (3)	+	-	-	+	-	+	-		
RA11 (4)	+	-	-	+	-	+	-		
RA11 (5)	+	-	-	-	-	+	-		
RF11 (1)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF11 (2)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF11 (3)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF11 (4)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF11 (5)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF12 (1)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF12 (2)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF12 (3)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF12 (4)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF12 (5)	+	-	+	-	+	+	+		
RF13 (1)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF13 (2)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF13 (3)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF13 (4)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF13 (5)	+	-	+	-	-	+	+	+	
RF14 (1)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF14 (2)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF14 (3)	+	-	-	-	-	+	-		
RF14 (4)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF14 (5)	+	-	+	-	-	+	-		
RF15 (1)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF15 (2)	+	-	+	-	-	+	-		
RF15 (3)	+	-	+	+	+	+	+	+	
RF15 (4)	+	-	-	+	-	+	+		
RF15 (5)	+	-	+	-	+	+	+		

LC: Leite Cru; S: Soro de queijo; 46: Caixa de recolhimento do soro; 47: Tanque de processamento da ricota; 50: Forma da ricota; 56: Parede; 57: Bancada 1 – processamento da ricota; 58: Bancada 2 – embalagem; 60: Ralo de esgotamento do soro; T: Tela de retenção; RA: Ricota antes de embalada; RF: Ricota depois de embalada.

As amostras que estão em negrito não foram confirmadas para o gênero *Enterococcus* e, portanto não foram realizadas a PCR.

APÊNDICE D

D1: Análises fenotípicas de fatores de virulência de *E. faecium* e *E. faecalis* isolados de matéria prima e ricota

Tabela D1. Análises fenotípicas de fatores de virulência de *E. faecium* e *E. faecalis* isolados de ricota depois de embalada

Espécie	Amostra*	Termonuclease	Hemolisina	Gelatinase
<i>E. faecium</i>	RF1 (1)	+	+	-
	RF1 (2)	+	+	-
	RF1 (3)	+	+	-
	RF1 (4)	+	+	-
	RF1 (5)	+	+	-
	RF2 (1)	+	+	-
	RF2 (2)	+	+	-
	RF2 (3)	+	+	-
	RF2 (4)	+	+	-
	RF2 (5)	+	+	-
	RF3 (1)	+	+	-
	RF3 (3)	+	+	-
	RF3 (4)	+	+	-
	RF3 (5)	+	+	-
	RF4 (1)	+	+	-
	RF4 (3)	+	+	-
	RF4 (4)	+	+	-
	RF4 (5)	+	+	-
	RF5 (1)	+	+	-
	RF5 (2)	+	+	-
	RF5 (3)	+	+	-
	RF5 (4)	+	+	-
	RF5 (5)	+	+	-
	RF6 (1)	+	+	-
	RF6 (3)	+	+	-
	RF6 (4)	+	+	-
	RF6 (5)	+	+	-
	RF7 (1)	+	+	-
	RF7 (3)	+	+	-
	RF7 (4)	+	+	-
	RF7 (5)	+	+	-
	RF8 (1)	+	+	-
	RF8 (2)	+	+	-
	RF8 (3)	+	+	-
	RF8 (4)	+	+	-

Continuação...

	<i>RF8</i> (5)	+	+	-
	<i>RF9</i> (1)	+	+	-
	<i>RF9</i> (2)	+	+	-
	<i>RF9</i> (4)	+	+	-
	<i>RF9</i> (5)	+	+	-
	<i>RF10</i> (1)	+	+	-
	<i>RF10</i> (2)	+	+	-
	<i>RF10</i> (3)	+	+	-
	<i>RF10</i> (4)	+	+	-
	<i>RF10</i> (5)	+	+	-
	<i>RF11</i> (1)	+	-	-
	<i>RF11</i> (2)	+	+	-
	<i>RF11</i> (3)	+	+	-
	<i>RF11</i> (4)	+	+	-
	<i>RF11</i> (5)	+	+	-
	<i>RF12</i> (1)	+	+	-
	<i>RF12</i> (2)	+	+	-
	<i>RF12</i> (3)	+	+	-
	<i>RF12</i> (4)	+	+	-
	<i>RF13</i> (1)	+	-	-
	<i>RF13</i> (2)	+	+	-
	<i>RF13</i> (3)	+	-	-
	<i>RF13</i> (4)	+	-	-
	<i>RF13</i> (5)	+	-	-
	<i>RF14</i> (1)	+	+	-
	<i>RF14</i> (2)	+	+	-
	<i>RF14</i> (4)	+	+	-
	<i>RF15</i> (1)	+	+	-
	<i>RF15</i> (3)	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	<i>RF3</i> (2)	+	+	-
	<i>RF4</i> (2)	-	-	-

*RF: Ricota depois de embalada.