

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Marcelo Augusto Ferraz

Monitoramento de *Enterobacteriaceae* e
Staphylococcus spp. na linha de produção de leite em
pó de uma indústria de laticínios de Minas Gerais
utilizando metodologias tradicional e rápida

Dissertação apresentada à Escola
de Veterinária - UFMG, como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciência
Animal.

Área: Tecnologia e Inspeção de
Produtos de Origem Animal

Orientadora: Profa. Mônica M. O.
P. Cerqueira

Belo Horizonte, UFMG –
EV/2009

F381m

Ferraz, Marcelo Augusto, 1981 –

Monitoramento de *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus* spp. na linha de produção de leite em pó de uma indústria de laticínios de Minas Gerais utilizando metodologias tradicional e rápida / Marcelo Augusto Ferraz. – 2009. 00 p. : Il.

Orientadora: Mônica M.O.P. Cerqueira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Leite em pó – Análise – Testes. 2. Leite em pó – Qualidade – Testes. 3. Enterotoxinas – Tese. 4. Enterobactérias – Teses. 5. Estafilococos – Testes. I. Cerqueira, Mônica Maria Oliveira Pinho. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD - 637

Dedicatória

Dedico esta vitória a Deus que está sempre presente em minha vida.

Uma mente que se abre à uma nova idéia jamais retorna ao tamanho original
“Albert Einstein”

Agradecimentos

- A Deus, pela força que me concede ao longo da vida.
- Aos meus pais, José Agostinho e Irma, sobretudo pelo exemplo de vida que sempre me dão.
- Aos meus irmãos que, mesmo à distância, sempre estão presentes e, em especial, a Magali que está continuamente ao meu lado.
- À Edila Amorim, Frederico Brito, Tiago Silva, Denise Oliveira e demais amigos que tornam mais fácil a minha caminhada.
- À Profa. Mônica M. O. P. Cerqueira que, além de orientadora, é uma pessoa fantástica que fez diferença em meu trabalho.
- À Maura Almeida de Moura (Lab. Microbiologia da EV – UFMG) e Naiara M. A. Silva (Graduanda EV – UFMG) pelo apoio fundamental durante a parte experimental deste trabalho.
- À Escola de Veterinária da UFMG, em particular o DTIPOA, pela acolhida.
- À 3M do Brasil, na pessoa do Paulo Basso, pela compreensão e apoio na realização deste trabalho e também a Adriana Tassinari pelas importantes dicas.
- A empresa de laticínios que gentilmente cedeu suas instalações, produtos e processos para parte experimental.
- Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para execução deste.

Resumo	11
Abstract.....	12
1. Introdução.....	13
2. Revisão de Literatura.....	14
2.1 Leite em pó	14
2.2 Microbiologia do leite em pó	15
2.2.1 <i>Enterobacteriaceae</i>	16
2.2.2 <i>Staphylococcus</i> spp.....	20
2.2.3 Enterotoxinas estafilocócicas	21
3. Objetivos.....	23
4. Material e Métodos.....	23
4.1 Local e Amostragem.....	23
4.2 Monitoramento de <i>Enterobacteriaceae</i> na linha de processamento de leite em pó	23
4.3 Monitoramento de <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. e enterotoxinas estafilocócicas em amostras de leite em pó	24
4.3.1 Pesquisa de <i>Enterobacteriaceae</i>	24
4.3.2 Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> spp.	25
4.3.3 Detecção de enterotoxinas estafilocócicas	26
5 <i>Análise Estatística</i>	27
6. Resultados e Discussão.....	28
6.1 Monitoramento de <i>Enterobacteriaceae</i> na linha de processamento de leite em pó	28
6.1.1 Pesquisa de <i>Enterobacteriaceae</i> na cadeia de produção de leite em pó.....	28
6.1.2 Pesquisa de <i>Enterobacteriaceae</i> no ambiente	34
6.2 Monitoramento de <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. e enterotoxinas estafilocócicas em amostras de leite em pó	34
6.2.1 Pesquisa de <i>Enterobacteriaceae</i>	34
6.2.2 Pesquisa de <i>S. aureus</i> e <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	36
6.2.3 Análise de Enterotoxinas de <i>Staphylococcus</i> spp.....	38
7 Considerações Finais	39
9 Referências Bibliográficas.....	39

Lista de Abreviaturas

ABLV – Associação Brasileira das Indústrias de Leite Longa Vida
AESAs – Associação Européia para Segurança de Alimentos
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA – American Public Health Association
APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
CIP – *Clean-in-place* – limpeza no local
DTA – Doenças Transmissíveis por alimentos
ELISA – Enzima Imunoensaio
FAO – Food and Agricultural Organization
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PCR – *Polymerase chain reaction* – Reação em cadeia de polimerase
SE – Enterotoxinas estafilocócicas
VRBG – Violet Red Bile Glucose – Vermelho violeta bile glicose

Lista de Tabelas

- Tabela 1. Médias de contagens de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL), nas cinco amostras, submetidas ou não a pré-enriquecimento..... p.29
- Tabela 2. Médias de contagens de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL), em amostras de leite cru, pasteurizado, em pó e na superfície de equipamento e da mão de manipulador usando-se o meio 3M Petrifilm, com e sem pré-enriquecimento..... p.29
- Tabela 3. Médias de contagens de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL), em amostras de leite cru, pasteurizado, em pó e na superfície de equipamento e da mão de manipulador usando-se o meio VRBG , com e sem pré-enriquecimento..... p.30
- Tabela 4. Comparação dos métodos 3M Petrifilm (PF) e VRBG na detecção de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL), em amostras de uma indústria de laticínios de Minas Gerais, sem pré-enriquecimento..... p.30
- Tabela 5. Comparação dos métodos 3M Petrifilm (PF) e VRBG na detecção de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL), em amostras de uma indústria de laticínios de Minas Gerais, com pré-enriquecimento..... p.31
- Tabela 6. Comparação dos resultados de detecção de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL) em amostras de uma indústria de leite em pó de Minas Gerais, utilizando-se o meio 3M Petrifilm e o meio VRBG..... p.31
- Tabela 7. Comparação múltipla dos resultados de detecção de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL) em amostras de uma indústria de leite em pó de Minas Gerais, utilizando-se o meio 3M Petrifilm sem pré-enriquecimento..... p.32
- Tabela 8. Comparação múltipla dos resultados de detecção de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL) em amostras de uma indústria de leite em pó de Minas Gerais, utilizando-se o meio 3M Petrifilm com pré-enriquecimento..... p.32
- Tabela 9. Comparação múltipla dos resultados de detecção de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL) em amostras de uma indústria de leite em pó de Minas Gerais, utilizando-se o meio VRBG sem pré-enriquecimento..... p.33
- Tabela 10. Comparação múltipla dos resultados de detecção de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL) em amostras de uma indústria de leite em pó de Minas Gerais, utilizando-se o meio VRBG com pré-enriquecimento..... p.33
- Tabela 11. Contagens médias de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL) em 30 amostras de leite em pó de uma indústria de Minas Gerais pelo meio 3M Petrifilm e VRBG..... p.34
- Tabela 12. Contagem média de *Staphylococcus* spp. (\log_{10} (UFC + 1)/g) de leite em pó utilizando-se a metodologia tradicional e o meio 3M Petrifilm..... p. 37

Lista de Figuras

- Figura 1. Fluxograma básico de produção de leite em pó..... p. 15
- Figura 2. Microrganismos representantes da família *Enterobacteriaceae*..... p. 17
- Figura 3. Principais gêneros pertencentes à família *Enterobacteriaceae* de importância em humanos..... p. 18
- Figura 4. Cartão de leitura do kit de detecção de enterotoxinas de *Staphylococcus*..... p. 27
- Figura 5. Colônias de *Enterobacteriaceae* no meio VRBG e nas placas 3M Petrifilm *Enterobacteriaceae*..... p. 28
- Figura 6. Resultado do teste de fermentação de glicose de amostra de leite em pó positiva para *Enterobacteriaceae*..... p. 35
- Figura 7. Teste de oxidase (Oxoid): controle negativo de *Salmonella* sp. p. 35
- Figura 8. Teste de oxidase (Oxoid) – controle positivo utilizando-se amostra de *Pseudomonas* sp. p. 36
- Figura 9. Teste de oxidase (Laborclin) de amostra de leite em pó..... p. 36
- Figura 10. Teste da DNase pelo 3M Petrifilm Staph Express realizado em amostras de leite em pó de uma indústria de laticínios de Minas Gerais..... p. 38

Resumo

A Diretiva 2073/2005 da União Européia contempla análises microbiológicas não consideradas pela legislação brasileira. Foram realizados dois experimentos em uma indústria de laticínios de Minas Gerais. O primeiro objetivou avaliar a presença de *Enterobacteriaceae* em vários pontos da cadeia de produção do leite em pó (leite cru, leite pasteurizado, leite em pó, *swabs* de equipamento e manipulador e ar), a influência do pré-enriquecimento sobre a recuperação microbiana e duas metodologias para enumeração de *Enterobacteriaceae* utilizando-se a metodologia tradicional e o método rápido 3M Petrifilm *Enterobacteriaceae*. As análises foram realizadas em sete períodos, durante três meses. O segundo experimento visou realizar a análise microbiológica completa da Diretiva 2073/2005, a saber: *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus* coagulase positivo e suas enterotoxinas. Foram utilizadas metodologias tradicional e rápida empregando-se as placas 3M Petrifilm (*Enterobacteriaceae* e *Staph Express*). Verificou-se que o pré-enriquecimento das amostras implicava em variação significativa na população inicial de *Enterobacteriaceae* apenas para o leite cru ($p < 0,05$). Quando se compararam as metodologias tradicional e 3M Petrifilm *Enterobacteriaceae*, notou-se equivalência entre elas em todas as amostras - com e sem pré-enriquecimento ($p > 0,05$). No ar da linha de produção, em apenas um dia, foram recuperadas duas colônias de *Enterobacteriaceae* na placa ($0,03 \text{ UFC/cm}^2$), o que não o sugere como fonte em potencial destes microrganismos. Quando comparada a contagem de *Enterobacteriaceae* no leite cru em relação aos demais pontos, houve diferença significativa ($p < 0,05$) o que o indica como principal fonte desta família de microrganismos e também que o processo desta empresa é eficiente na redução de *Enterobacteriaceae*. Das 30 amostras de leite em pó, apenas duas apresentaram resultado positivo para *Enterobacteriaceae*, sendo que apenas uma não atendeu a Diretiva 2073/2005 (20 UFC/g). Houve equivalência entre os métodos tradicional e 3M Petrifilm *Enterobacteriaceae* ($p > 0,05$). Para análise de *Staphylococcus*, houve diferença entre os métodos tradicional e 3M Petrifilm *Staph Express* ($p < 0,05$), sendo que o primeiro apresentou colônias típicas e atípicas no meio Baird-Parker, porém todas apresentaram resultado negativo para o teste de coagulase. Utilizando-se o meio 3M Petrifilm, verificou-se presença de *Staphylococcus aureus* em 46,7% das amostras. No entanto, todas atenderam a Diretiva 2073/2005 e a legislação Brasileira, com média de 8 UFC/g . Para enterotoxinas estafilocócicas, 100% das amostras testadas apresentaram resultado negativo. Conclui-se que, para a indústria em questão, os resultados desta pesquisa a indicam como potencial exportadora de leite em pó para União Européia, pois atendem aos parâmetros estabelecidos pela Diretiva 2073/2005.

Palavras chave: *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, Enterotoxinas, Leite em Pó, Petrifilm.

Abstract

The 2073/2005 Directive from European Union issues the microbiological analysis is not considered by Brazilian law. There were done two trials in a dairy company in Minas Gerais State. The first aimed to assess the presence of *Enterobacteriaceae* along several steps of the milk powder production chain (raw milk, pasteurized milk, milk powder, equipment swab, manipulator swab and air), the influence of the previous enrichment on the microbial recuperation and two methodologies to number the *Enterobacteriaceae* by using both the 3M Petrifilm *Enterobacteriaceae* traditional and fast methodology. The analyses were tested in seven phases along three months. The second experiment aimed to accomplish the complete microbiological analysis of the 2073/2005 Directive that means *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* coagulase positive and its enterotoxins. It was also used both the traditional methodology and the 3M Petrifilm plates (*Enterobacteriaceae* and *Staph Express*). It was seen that the previous enrichment of the samples involved a significant variation on the initial population of the *Enterobacteriaceae* only to raw milk ($p < 0, 05$). When the methodologies were compared – traditional and 3M Petrifilm *Enterobacteriaceae*, it was observed the equivalence between them in all the samples – with or without previous enrichment – ($p > 0, 05$). At the production air, only in a single day, there were recovered two *Enterobacteriaceae* colonies on the plate ($0, 03 \text{ UFC/cm}^2$), however it does not suggest as a potential source of these microorganisms. When the counting of *Enterobacteriaceae* in the raw milk related to the other positions, there was a significant difference ($p < 0, 05$) what indicates it as the main source of this microorganisms family and also that the process of this company is efficient to reduce the *Enterobacteriaceae*. From the 30 (thirty) samples of milk powder, only two presented positive result to *Enterobacteriaceae*, even though only one of them does not answered the 2073/2005 Directive (20UFC/g). There was equivalence between both the traditional methodology and the 3M Petrifilm *Enterobacteriaceae* ($p > 0, 05$). To the *Staphylococcus* analysis there was a difference between both the traditional methodology and the 3M Petrifilm *Staph Express* ($p > 0, 05$), since the first presented typical and atypical colonies in the Baird-Parker main, but all presented negative result to the coagulase test. Using the 3M Petrifilm mean it was ensured the presence of *Staphylococcus aureus* in 46,7% of the samples. However all of them accomplished the 2073/2005 Directive and the Brazilian law, in the average of 8UFC/g. To the staphylococci enterotoxins, 100% of the tested samples presented negative result. It can be concluded to the industry studied, the results of this research indicates it as a potential exporter of milk powder to the European Union because it fulfills the established standards by the 2073/2005 Directive.

Key Words: *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, Enterotoxins, Milk Powder, Petrifilm.

1. Introdução

Em 2007, o Brasil produziu 505 mil toneladas de leite em pó e a estimativa para 2008 era em torno de 535 mil toneladas, um crescimento superior a 5% (EMBRAPA, 2008). Segundo estimativas da SERLAC, *trading* responsável pela maior parte das exportações brasileiras de lácteos, o Brasil deve aumentar sua produção de leite em pó em 40% chegando em 2012 a 700 mil toneladas ao ano. Atualmente, apenas 15% do leite em pó produzido no Brasil são exportados, mas com a ampliação de algumas plantas e novos projetos em andamento, estima-se que cerca de 35% da produção brasileira de leite em pó possam ser exportadas até 2012 (Terra Viva, 2008).

A alta dos preços internacionais é explicada pela crescente demanda em países da Ásia, África e América Latina. Eles devem elevar o consumo mundial em 3%, enquanto a produção não deve crescer mais que 2%. A redução dos subsídios na União Européia (à produção e à exportação) também afeta a oferta mundial de leite (Milkpoint, 2007).

Segundo o vice-presidente da Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida (ABLV), empresas que exportam leite em pó disputam matéria-prima com empresas do setor de leite longa vida, sem contar que algumas têm priorizado a produção do leite em pó para aproveitar os altos preços internacionais (Milkpoint, 2007).

Entretanto, o leite e seus derivados são frequentemente envolvidos em surtos de doenças transmissíveis por alimentos em todo o mundo, sendo que muitos microrganismos patogênicos podem ser veiculados ao homem pelo consumo desses produtos (De Buyser, 2001). O que implica na importância de controles efetivos na qualidade higiênico-sanitária destes produtos.

Alimentos contaminados por microrganismos patogênicos constituem

uma importante fonte de doenças para o ser humano. Assim, a segurança dos alimentos é garantida, sobretudo, por uma abordagem preventiva, como, por exemplo, na implantação de boas práticas de higiene e na aplicação de procedimentos baseados nos princípios de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Os critérios microbiológicos podem ser utilizados na validação e verificação de procedimentos do Sistema APPCC, bem como de medidas de controle dos processos de higienização.

Entre os microrganismos importantes que podem contaminar o leite e seus derivados, destacam-se os pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, frequentemente usados como um indicador de qualidade de produto acabado e também de boas práticas higiênicas na produção (Mullane et al., 2006), pois além dos coliformes, englobam outros microrganismos. A sua pesquisa tem sido uma constante na União Européia como indicador de qualidade dos alimentos e como índice de segurança alimentar. O uso do grupo de coliformes como indicador de qualidade é uma tradição baseada em organizações dos Estados Unidos. A pesquisa de *Enterobacteriaceae* é preferida na União Européia considerando os gêneros glicose-positivo e lactose-negativo, que não são contemplados na análise de coliformes (Kornacki e Johnson, 2001).

Também de grande importância na microbiota de leite em pó é o *Staphylococcus* spp. que é uma bactéria em formato esférico (coco), anaeróbio facultativo, Gram-positivo e ocorre em pequenas cadeias similares a um cacho de uva. Podem ser encontrados no ar, na poeira, na água, no leite e em alimentos em geral, equipamentos de processamento de alimentos, seres humanos e animais, sendo estes dois últimos os principais reservatórios (Forsythe, 2002).

Embora seja um microrganismo termo-sensível, o *Staphylococcus* spp. produz enterotoxinas termo-estáveis, que resistem a processos térmicos como a pasteurização e ultrapasteurização (Omoe et al., 2005). Quando há presença do microrganismo no leite cru e não houver um adequado acondicionamento, pode haver a proliferação microbiana com conseqüente produção de enterotoxinas (em função das condições do meio), que resistirão a tratamentos térmicos posteriores (Richter e Vedamuthu, 2001). As enterotoxinas são proteínas de baixo peso molecular (26.000 a 34.000 Da) as quais são diferenciadas por sorologia (Forsythe, 2002). A identificação de *S. aureus* em produtos que sofreram tratamento térmico pode indicar processo ineficiente ou contaminação pós-processo.

Ikeda et al. (2005) citaram a existência de 14 enterotoxinas

estafilocócicas (SE), a saber A (SEA), SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN e SEO, porém apenas as cinco primeiras (SEA a SEE) podem ser detectadas por kits comerciais.

As contaminações por estes microrganismos são relevantes e podem representar riscos para as indústrias de laticínios devido às restrições de comércio, inclusive internacionais. Portanto, considerando que a legislação brasileira não contempla análise de *Enterobacteriaceae* e, que no Brasil, apenas as empresas que exportam para países específicos ou multinacionais em que seu país de origem exige este tipo de análise, a realizam, este trabalho se propôs a avaliar a presença destes microrganismos no leite cru e em diferentes etapas do processamento tecnológico do leite em pó.

2. Revisão de Literatura

2.1 Leite em pó

A produção do leite em pó inicia-se com a recepção do leite cru e posterior padronização de seu teor de gordura. Após, o leite passa por um processo de concentração por evaporação que ocorre sob vácuo quando então segue para a secagem, que é a etapa final. Quando este processo ocorre por sistema de atomização, o leite concentrado anteriormente é direcionado a uma bomba de alta pressão

que o transporta, sob pressão, para a câmara de secagem que pulveriza o concentrado em gotículas. O impacto do ar quente no interior da câmara de secagem com estas gotículas leva à formação do pó, que é removido da câmara por raspadores mecânicos (Robinson, 2002).

Na Figura 1, é apresentado o fluxograma básico de produção de leite em pó integral.

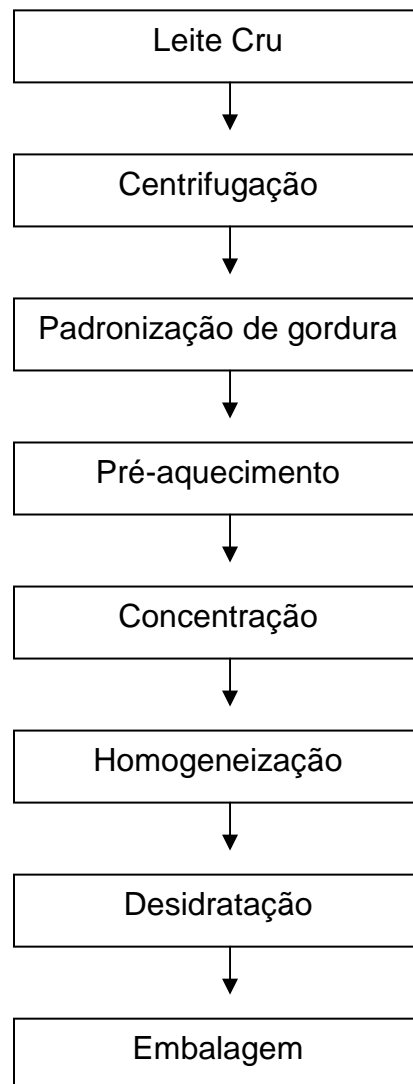


Figura 1. Fluxograma básico de produção de leite em pó
 Fonte: Adaptado de Pearce (2008).

Em geral, o processo de fabricação do leite em pó reduz de 5 a 6 ciclos logarítmicos o número total de bactérias, que em muitas vezes é suficiente para atender os padrões da legislação brasileira (Oliveira

et al., 2000), considerando os padrões microbiológicos do leite cru e os procedimentos higiênico-sanitários adequados durante e após o processamento.

2.2 Microbiologia do leite em pó

Doenças transmissíveis por alimentos (DTA) apresentam um grande impacto em saúde pública. Nos Estados

Unidos, estima-se que, a cada ano, de 6 a 80 milhões de pessoas sejam acometidas por alguma DTA gerando em torno de 9.000 mortes e acarretando um custo aproximado de US\$5 bilhões (Altekruse et al., 1997). No Brasil, devido à subnotificação, não há

dados concretos sobre o número de DTA's bem como demais indicadores.

A presença de microrganismos no ambiente de processamento de alimentos pode contribuir para a contaminação do produto final que resultará na redução de sua qualidade e segurança microbiológica. Podem ser citadas como fonte de contaminação microbiológica ambiental a matéria-prima, os equipamentos do processo, as atividades de produção e manutenção, os operadores, o resíduo industrial e as pragas (Sveum et al., 1992).

A microbiota de leite em pó é afetada pelos binômios de tempo e temperatura aplicados durante o processo térmico, a saber, pré-aquecimento, concentração e secagem. As bactérias psicrotróficas, coliformes e fungos são reduzidos em níveis muito baixos durante o tratamento térmico. Sua presença em níveis elevados no produto final indica qualidade ruim do leite cru, contaminação do equipamento e ou ambiente durante ou após a manufatura (Richter e Vedamuthu, 2001).

2.2.1 *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* pertence ao grupo de microrganismos considerados indicadores. Este termo pode ser utilizado a qualquer grupo taxonômico,

fisiológico ou ecológico de microrganismos, cuja presença ou ausência sugere uma evidência indireta da qualidade da amostra. Em geral, os microrganismos pertencentes a esta família são associados a componentes da microbiota intestinal. Entretanto, outros grupos de microrganismos também podem ser utilizados como indicadores (Forsythe, 2002).

Membros da família *Enterobacteriaceae* são encontrados no trato gastrointestinal de animais, mas muitos vivem livremente no solo, na água e no ambiente. Essa família é composta por bactérias anaeróbias facultativas, Gram negativo e oxidase negativo, que podem fermentar ou respirar, dependendo das condições ambientais. Estes microrganismos estão envolvidos em processos de deterioração de alimentos e são utilizados como indicadores de qualidade higiênico-sanitária, sendo alguns, patogênicos. A *Escherichia coli* é um membro clássico dessa família.

Esta família engloba os coliformes, como também *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., entre outros (Figura 2). Os gêneros de maior importância em humanos são os mais patogênicos e os mais comumente encontrados (Figura 3).

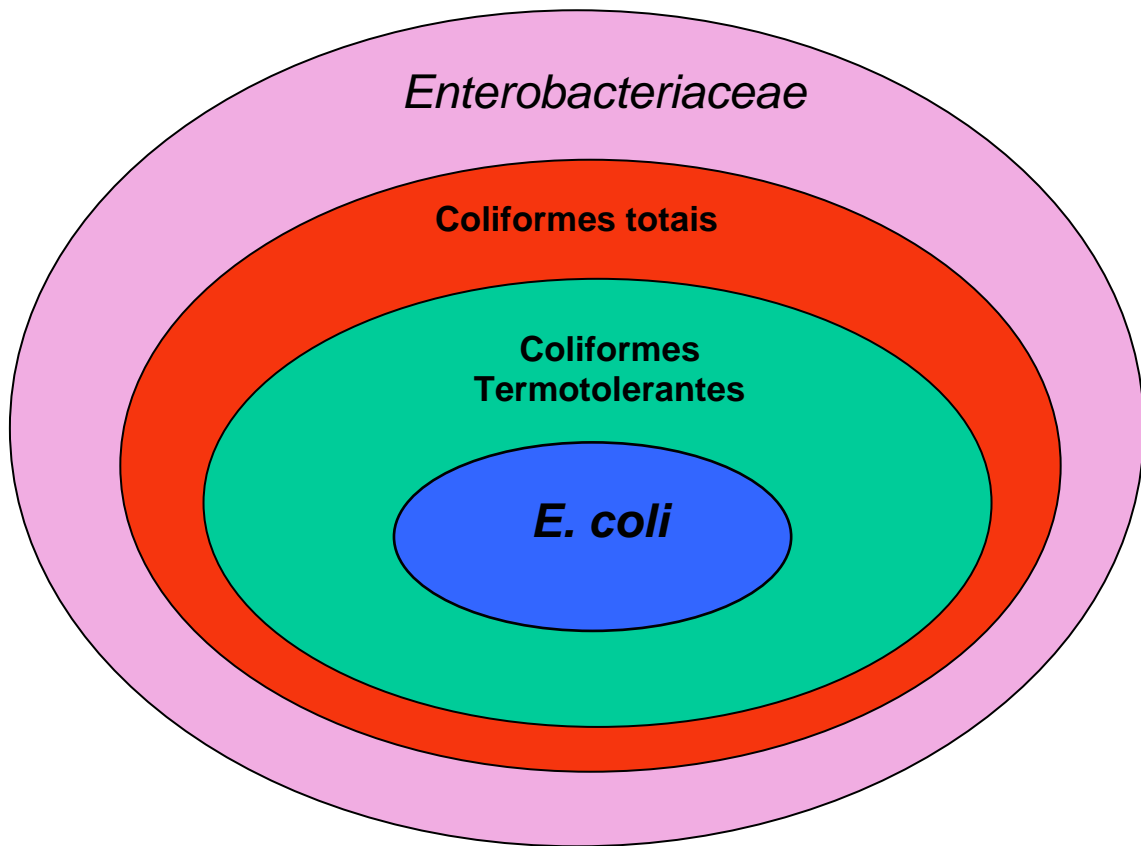


Figura 2. Microrganismos representantes da família *Enterobacteriaceae*.

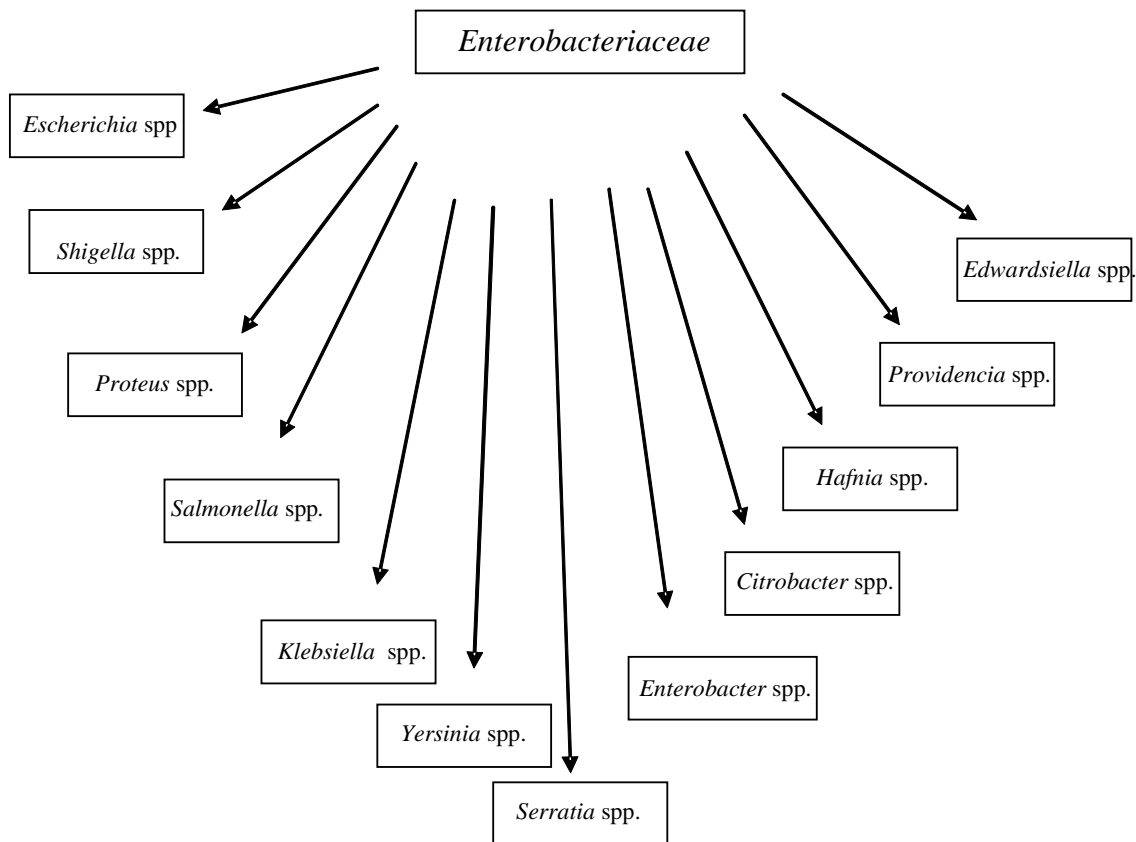


Figura 3. Principais gêneros pertencentes à família *Enterobacteriaceae* de importância em humanos (SOM 208 Microbiology, 2007).

Uma característica importante dessa família é que seus componentes podem fermentar glicose com produção de piruvato (ácido pirúvico), que é então convertido em diferentes produtos finais, dependendo das espécies. Além disso, a maioria produz gás a partir da fermentação da glicose. A realização de testes em ambientes (ar de produção) para *Enterobacteriaceae* em áreas de processamento de alimentos pode constituir um instrumento útil para a identificação e prevenção da presença de microrganismos patogênicos nos alimentos (SOM 208 Microbiology, 2007).

O número de gêneros e espécies da família *Enterobacteriaceae* tem aumentado. Atualmente, contém 44 gêneros e 176

espécies nomeados (Brenner e Farmer, 2005).

No Brasil, conforme legislações vigentes, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA – RDC n.º 12 de 2001) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA – IN 62 de 2003), o grupo dos coliformes é utilizado como indicador de qualidade higiênico sanitária. Segundo Kornacki e Johnson (2001), coliforme é um grupo que inclui bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, Gram-negativo, não formador de esporos e que fermenta lactose, com produção de ácido e gás em 48h a 35°C, em meio seletivo. Também reforçam que não há validade taxonômica para o grupo de

bactérias coliformes, que são definidos com base em reações bioquímicas e não há relação genética. Em Marshall (1992), há citação que para produtos lácteos a temperatura de 32°C, ao invés de 35°C, tem-se uma melhor recuperação dos coliformes.

Em painel realizado pela Autoridade Europeia para a Segurança de Alimentos (AESA), em nove de setembro de 2004, foram citados os microrganismos *Salmonella* spp. e *Enterobacter sakazakii* como de maior relevância nas fórmulas para lactantes e/ou fins medicinais específicos. Considerando que as bactérias supracitadas fazem parte da família *Enterobacteriaceae*, esta pode ser utilizada como um indicador de risco na indústria. A AESA recomendou o monitoramento e a realização de testes relativos à *Enterobacteriaceae*, tanto nas zonas de industrialização como em produto acabado. Além das espécies patogênicas, a família *Enterobacteriaceae* inclui também espécies ambientais, frequentemente presentes nas zonas de processamento de alimentos, sem que constituam qualquer perigo à saúde, embora possam indicar a possível presença de patógenos. Assim, a família *Enterobacteriaceae* pode ser utilizada na rotina e, caso esses microrganismos estejam presentes, testes para detecção de agentes patogênicos específicos podem ser realizados (Jornal Oficial da União Europeia, 2005).

Bactérias da família *Enterobacteriaceae* são sensíveis, além do calor, aos sanitizantes, devendo, portanto, serem monitoradas no ambiente da fábrica. A presença de microrganismos dessa família, após os procedimentos de higienização, indica a ineficiência desse processo. Membros dessa família comumente colonizam ambientes secos e úmidos e são excelentes indicadores de contaminação de equipamentos por fontes ambientais (Zink, 1995).

A importância de seres humanos como fonte de contaminação de ar ambiental e de produto acabado é discutida

com particular referência para a indústria de laticínios. Os gêneros de maior relevância, em termos de contaminação ambiental, são os da família *Enterobacteriaceae*. As barreiras físicas, aliadas aos padrões corretos de higiene operacional e pessoal, como por exemplo, a utilização de uniformes adequados, é considerada efetiva na redução de tal contaminação (Frontini, 1996).

Para produtos em que seu processo de fabricação possa injuriar as células microbianas, como o leite em pó, um pré-enriquecimento pode facilitar a recuperação dos microrganismos em um meio não seletivo ou moderadamente seletivo (Sperber et al., 2001). Ressalta-se que o processo de enriquecimento é adequadamente empregado para microrganismos patogênicos quando se pesquisa presença ou ausência. Porém para microrganismos indicadores em que há especificação de limite aceitável, pode haver distorção na contagem real, uma vez que o pré-enriquecimento pode permitir a multiplicação de microrganismos pré-existent.

Lues e Tonder (2007), ao avaliarem a presença de *Enterobacteriaceae* em mãos de manipuladores de alimentos, observaram resultados positivos em 44% da população. Os resultados variaram entre 5 e 18 UFC/cm². Não há padrões em legislação específica para *Enterobacteriaceae* em mão de manipulador, tipo *swab*, porém para os padrões exigidos para produto acabado, por exemplo, da União Europeia, presume-se que os resultados negativos são esperados, uma vez que a contaminação da mão do manipulador pode atingir o produto.

Iversen e Forsythe (2004) encontraram resultados positivos para *Enterobacteriaceae* em sete amostras das 82 pesquisadas em fórmulas lácteas infantis desidratadas e em produtos correlatos. Quando há resultados positivos para *Enterobacteriaceae*, pesquisas específicas subsequentes são requeridas, uma vez que nessa família estão incluídas bactérias

patogênicas que podem ser letais, considerando o público-alvo deste grupo de alimentos.

Em avaliação microbiológica de 11 marcas de leite em pó de Bangladesh, Ahmed e Anwar (2006) encontraram valores de coliformes totais de <3NMP/g e ausência para *Salmonella* spp., sendo que estes são membros da família *Enterobacteriaceae*.

Em pesquisa realizada por Santos (2006), foi avaliada a presença de *Enterobacteriaceae* em vacas portadoras de mastite. Esses microrganismos foram isolados em 24,39% (20/82) das amostras, sendo que individualmente, em apenas dois casos, detectaram-se em uma vaca com mastite clínica e em outra com mastite subclínica. A identificação bioquímica demonstrou que a *Escherichia coli* foi a espécie mais frequente dentre as *Enterobacteriaceae* isoladas, sendo identificada em 75% (15/20) das ocasiões. Nas amostras provenientes de vacas com mastite clínica, a *E. coli* foi isolada em 76,92% (10/13) dos casos. Santos e Fonseca (2007) citaram que *Enterobacteriaceae* podem ser agentes causadores de mastite ambiental, cujo principal reservatório é o ambiente em que a vaca está inserida, ressaltando o acúmulo de esterco, urina, barro e camas orgânicas.

Enterobacter sakazaki, membro da família *Enterobacteriaceae*, tem sido reconhecido como um patógeno emergente causador de doenças de origem alimentar e há relatos envolvendo neonatos debilitados. A população de risco à infecção é composta, sobretudo, por bebês prematuros ou recém-nascidos, bebês imunodeprimidos de qualquer idade e bebês que necessitem de cuidados especiais (Unidade de Terapia Intensiva - neonatal). Apesar do reservatório e do modo de transmissão de *E. sakazaki* não estarem claramente identificados, relatos mostraram que fórmulas infantis desidratadas, a base de leite, foram a fonte e o veículo de infecções para a população de risco (Gillio, 2006).

Em uma pesquisa realizada pela Food and Agriculture Organization (FAO), de 141 amostras de leite em pó de 35 países, 14% estavam contaminadas com a bactéria *Enterobacter sakazaki* (Garen, 2006). Segundo Nazarowec-White e Farber (1997), *E. sakazaki* é um dos membros que apresenta maior termotolerância da família *Enterobacteriaceae* encontrados em produtos lácteos. Porém não resiste a uma pasteurização a 72°C por 15s (Dancer, 2009).

Na União Européia, os padrões para *Enterobacteriaceae* em leite pasteurizado e em outros produtos lácteos líquidos pasteurizados (que não serão posteriormente processados) são $n = 5$ e $c = 2$, $m < 1$ UFC/mL e $M = 5$ UFC/mL. Para leite em pó e soro de leite em pó, $n=5$ e $c=0$, tem-se $m = M = 10$ UFC/g. Para sorvetes e sobremesas lácteas congeladas, tem-se $n = 5$ e $c=2$, $m=10$ UFC/g e $M = 100$ UFC/g. Para fórmulas desidratadas para lactentes e alimentos destinados para fins medicinais específicos para lactentes com menos de seis meses, tem-se $n = 10$ e $c = 0$, $m = M =$ ausência em 10g (Jornal Oficial da União Européia, 2005). Sendo que n representa o tamanho da amostra, c o número de amostras que pode apresentar contagem maior que m e menor que M , m é o valor esperado e M é o limite máximo de contagem microbiana.

A legislação brasileira não contempla análise de *Enterobacteriaceae* e, de modo geral, no Brasil, o monitoramento destes microrganismos somente é realizado quando o país que importa produtos do Brasil, exige tal análise.

2.2.2 *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus spp. são exigentes em termos de requerimentos nutricionais. Por exemplo, para seu crescimento é necessária a presença do aminoácido valina e a combinação arginina e cistina é necessária para ambos o crescimento e a

produção de enterotoxina estafilocócica (SE) em cinco estirpes de *S. aureus* que produzem SEA, SEB ou SEC. As necessidades para os demais aminoácidos variam de acordo com a estirpe (Onoue e Mori, 1997). Stencl (1999) cita que em termos de atividade de água (Aw), o *S. aureus* precisa de um valor mínimo de 0,86 para seu crescimento e 0,87 a 0,90 para produção de SEA e 0,97 para produção de SEB.

Considerando que um dos grandes reservatórios de *Staphylococcus* spp. é o ser humano, o fato de um alimento ser manipulado indica uma provável contaminação pelos microrganismos deste gênero. Também há de se considerar que os animais podem ser a origem do microrganismo, uma vez que algumas espécies de *Staphylococcus* spp. podem estar associadas a casos de mastite bovina (Sant'Ana e Azeredo, 2005). Assim, a utilização do leite proveniente de vacas portadoras de mastite, causada por *S. aureus*, pode torná-lo potencialmente veiculador de intoxicações alimentares (Fagundes e Oliveira, 2004).

Com relação à mastite bovina, o *S. aureus* pode ser encontrado colonizando o canal do teto, o interior da glândula ou mesmo a pele do teto, principalmente quando esta se apresenta lesada. A transmissão pode ocorrer, sobretudo por meio das mãos do ordenhador e dos panos ou esponjas de uso múltiplo (Santos e Fonseca, 2007). O *S. aureus* tem sido o agente mais frequentemente isolado tanto de mastites clínicas como subclínicas em vacas leiteiras (Ferreira et al., 2006).

S. aureus é um microrganismo que apresenta elevada resistência a antimicrobianos. Em estudo realizado por Farzana et al. (2004), de 50 amostras de leite cru, todas apresentavam contaminação por *Staphylococcus* coagulase positivo e nos testes com antimicrobianos, as estirpes apresentaram elevada resistência a maioria deles. Rapini et al. (2004) destacaram a importância de medidas de controle do uso

de antimicrobianos, para fins médicos e veterinários, com base em estudo sobre resistência de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de amostras de queijo coalho.

Ahmed e Anwar (2006), em estudo em Bangladesh, também realizaram contagem de *Staphylococcus* spp. em leite em pó e os valores ficaram entre $6,0 \times 10^1$ e $8,2 \times 10^2$ UFC/g.

Na Diretiva 2073 (Jornal Oficial da União Européia, 2005), os padrões de *Staphylococcus* coagulase positivo são $n = 5$, $c = 2$, $m = 10\text{UFC/g}$ e $M = 100\text{ UFC/g}$, sendo que para contagens acima de 10^5 UFC/g, há necessidade de se testar a amostra para enterotoxinas estafilocócicas.

Em termos de identificação de *Staphylococcus*, o meio Baird-Parker baseia-se em características diferenciais como a redução do telurito de potássio à telureto de potássio, produzindo colônias negras e a capacidade de hidrolisar a gema de ovo, formando halos ao redor das colônias (Lancette e Bennett, 2001). Com relação à Instrução Normativa N° 62 (Brasil, 2003), as colônias selecionadas do meio Baird-Parker são semeadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) e posteriormente, realiza-se o teste de coagulase, sendo que o *S. aureus* é coagulase positivo. Porém, alguns autores citam que o teste de coagulase é indireto, útil para detecção de cepas potencialmente enterotoxigênicas, mas podem ou não diferenciar cepas enterotoxigênicas das não enterotoxigênicas, uma vez que já foram isoladas cepas enterotoxigênicas de *Staphylococcus* coagulase negativo (Wilson et al., 1991, Veras et al., 2008).

2.2.3 Enterotoxinas estafilocócicas

As intoxicações alimentares causadas por estafilococos são originadas da ingestão das enterotoxinas produzidas por estes microrganismos, que ocorre principalmente nos alimentos antes do consumo (Wong e Bergdoll, 2002). Os

principais sintomas são náuseas, cólicas abdominais e diarreia (Scherrer et al., 2004). O período de incubação varia de 15 minutos à 6h após a ingestão do alimento contaminado sendo que a média fica entre 2 e 4h (Franco e Landgraf, 2003).

Pereira et al. (2001) citaram que, normalmente, as espécies coagulase negativo não representam interesse de estudo em epidemiologia das intoxicações estafilocócicas, embora vários estudos comprovem que existem espécies coagulase negativo produtoras de enterotoxinas. Em trabalho realizado com manipuladores de queijo de cabra, foram isoladas várias cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo produtores de enterotoxinas e a toxina da Síndrome do Choque Tóxico (Rapini et al., 2005).

Entre as doenças de origem alimentar ocorridas na França entre 1999 e 2000, o *Staphylococcus aureus* encontra-se em segunda posição com participação de 25,6% no número de casos, ficando em primeira posição a *Salmonella*, pertencente à família Enterobacteriaceae, com 47,7% (Haeghebaert et al., 2002). As enterotoxinas estafilocócicas são os principais agentes de intoxicação de origem bacteriana no homem e têm sido relatadas em vários surtos de doenças transmissíveis por alimentos (Lamaita et al., 2005).

As enterotoxinas estafilocócicas apresentam alta resistência a tratamentos térmicos e quando no alimento apresentam resistência ainda maior que em meios de cultura no laboratório. Em alguns casos, como em esterilização de alimentos enlatados, as SE's podem ser eliminadas se estiverem em baixas concentrações (Bergdoll, 1983 citado por Le Loir et al., 2003). Além disso, elas apresentam funções de toxinas gastrointestinais potentes como também superantígenos que estimulam a proliferação de células-T não específicas (Balaban e Rasooly, 2000).

Em um surto ocorrido no Japão, em 2000, causado pela ingestão de leite reconstituído (a partir de leite em pó

desnatado) contaminado com SE, foram reportados mais de 10.000 casos. Não foram encontrados *Staphylococcus* na análise de cultivo. Porém em análise de PCR em tempo real foi identificado o DNA de células mortas (ou não recuperáveis pelo método de cultivo), reforçando o fato de o *Staphylococcus* ser termo-sensível e as SE termo-estáveis (Ikeda et al., 2005)^b.

Em um trabalho realizado para pesquisar a possibilidade de ocorrer crescimento de *S. aureus* e produção de SEA em leite desnatado concentrado em processo para fabricação de leite em pó, constatou-se que pode haver dependência da concentração de sólidos do leite concentrado, mas que também é dependente da temperatura de armazenamento, sendo que esta variável apresenta maior relação com crescimento do microrganismo e produção de SEA. Considerando uma contagem de 10² UFC/mL de *S. aureus* no leite concentrado armazenado, a concentração de SEA não foi detectável utilizando-se o método que emprega Vidas e Mini-Vidas (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) quando armazenado a 35°C por 6h, 25°C por 10h e 15°C por 24h (Soejima et al., 2007). Também, os autores indicaram que caso haja uma falha no sistema elétrico da indústria e se os parâmetros citados nestes três binômios não forem respeitados, o leite armazenado deveria ser descartado pela provável produção de SE.

Entre 37 amostras de leite em pó na Irlanda do Norte, pesquisaram-se as toxinas A, B, C e D e em nenhuma delas foi detectada a presença de SE. Utilizou-se o método ALRP (Aglutinação em Látex Reversa e Passiva) e segundo o fabricante (Oxoid) o limite de detecção do kit é 2ng/mL de extrato da amostra (Harvey e Gilmor, 1990).

3. Objetivos

3.1 Monitorar o ambiente de uma fábrica de leite em pó, visando à detecção de microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, no ar, na superfície de equipamentos e em manipuladores da área de processamento tecnológico.

3.2 Monitorar a presença de *Enterobacteriaceae* no leite cru, utilizado como matéria-prima na fabricação do leite em pó.

3.3 Monitorar a presença de *Enterobacteriaceae* no leite pasteurizado em processo e no leite em pó produzido, simultaneamente à pesquisa no ambiente e em manipuladores.

3.4 Identificar as prováveis fontes de contaminação por *Enterobacteriaceae* em uma fábrica de processamento de leite em pó.

3.5 Comparar as metodologias ISO 21528:2 e 3M Petrifilm *Enterobacteriaceae* na enumeração de *Enterobacteriaceae*

3.6 Avaliar a qualidade microbiológica do leite em pó visando às exigências da Diretiva 2073/2005 da União Européia, a saber, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* coagulase positivo e SE.

4. Material e Métodos

4.1 Local e Amostragem

O monitoramento de *Enterobacteriaceae* foi realizado em uma indústria processadora de leite em pó de grande porte situada no Estado de Minas Gerais. Para seleção da empresa, foram considerados alguns pontos sendo que o de maior relevância foi o potencial desta fábrica para exportação de leite em pó para União Européia. Além de já exportar para alguns países, essa indústria possui capacidade instalada para produção em

larga escala de leite em pó, sendo que sua adequação às normas européias acarretaria em ganhos tecnológicos e financeiros para si própria como também para o setor laticinista de Minas Gerais e do Brasil. Para o experimento, foi utilizado leite em pó integral. O processo produtivo se inicia na recepção do leite cru, padronização e em seguida segue para a pasteurização. Após faz-se uma concentração, por evaporação, quando então o leite segue para a torre de secagem. O leite é desidratado em spray-drying.

A análise de *Enterobacteriaceae* não é contemplada na legislação brasileira, apenas os coliformes totais e termotolerantes, que fazem parte desta família. Para melhor conhecimento do assunto, foi realizado inicialmente um monitoramento de *Enterobacteriaceae* em diferentes pontos da indústria: superfície de equipamentos e de mãos de manipuladores, ar do ambiente de produção e amostras de leite cru, leite pasteurizado e leite em pó.

Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso (SAMPAIO, 2007), sendo que cada coleta, realizada em dia de produção diferente, representou um bloco. Foram realizadas sete coletas num período total de três meses. Ao final dessa primeira etapa, foram coletadas 30 amostras de leite em pó de diferentes lotes, caracterizados por sua data de produção, coletadas no mês de julho de 2008. Neste grupo de amostras, foram realizadas as análises microbiológicas consideradas pela Diretiva 2073/2005 da União Européia, a saber, contagem de *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus* coagulase positivo. Para contagens acima de 10^5 de *Staphylococcus*, esta norma exige análise de SE.

4.2 Monitoramento de *Enterobacteriaceae* na linha de processamento de leite em pó

Foram realizados “swabs” de superfície em um tanque de estocagem de leite pasteurizado, em sete períodos

diferentes, e a coleta foi realizada após o procedimento de higienização, que consiste em limpeza tipo CIP (Clean-in-place), na seguinte sequência: detergente alcalino e, após, detergente ácido. Também foi amostrada a mão do manipulador e o material (superfície de equipamento e da mão) foi semeado pela técnica de estria, com 3M *Quick swab* umedecido em Caldo Letheen (3M EUA, 2003). Para o monitoramento do ar, placas contendo o meio seletivo foram expostas por 15 minutos no ambiente de produção de leite em pó, conforme descrito por Marshall (1992) citado por Evancho et al. (2001). No mesmo dia foram coletadas amostras de leite cru de um silo, onde o leite fica armazenado e resfriado, leite pasteurizado em processo (tanque de estocagem) e, finalmente, leite em pó integral no momento do envase.

As amostras obtidas foram posteriormente submetidas a diluições decimais e inoculadas em 3MTM PetrifilmTM *Enterobacteriaceae* e meio VRBG (Violet Red Bile Glucose Ágar), conforme metodologia proposta por Kornachi e Johnson (2001). Foram realizados dois tratamentos, um pré-enriquecimento (não seletivo) em água peptonada tamponada 0,1% e incubação das amostras a 37°C por 18h (+/-2) e posterior inoculação. O outro tratamento foi a inoculação direta da amostra, sem o pré-enriquecimento. O objetivo desta etapa adicional foi avaliar se há diferença na recuperação dos microrganismos da família *Enterobacteriaceae*. Para as análises de *Swab*, 1mL do 3M *Quick Swab* foi adicionado em 9mL de água peptonada tamponada 0,1%. A placa de monitoramento ambiental não passou pelo tratamento de pré-enriquecimento. Para as amostras de leite cru, pasteurizado e em pó, foram pesados 25 g de amostra para 225 mL de água peptonada tamponada 0,1% e, então, realizadas cinco, três e duas diluições decimais, respectivamente.

Para as análises com as placas 3M Petrifilm, as amostras foram inoculadas na placa e então foi aplicado um difusor para realizar o espalhamento da amostra numa área de 20cm². Para a outra metodologia, foi preparado o Agar VRBG (Difco, 21866), conforme recomendação do fabricante. Então as amostras foram inoculadas em placa de Petri, de acordo com as diluições citadas acima e então foi adicionada a primeira camada de VRBG. Após solidificação do meio, foi aplicada uma sobrecamada. Então, as placas foram incubadas invertidas a 37°C por 24h +/- 2h.

Foram consideradas, para efeito de contagem, as placas entre 15 e 100 colônias nas placas 3M Petrifilm *Enterobacteriaceae* (3M EUA, 2006) e para as placas contendo VRBG um número inferior a 150 colônias (ISO 21528-2:2004).

4.3 Monitoramento de *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus spp.* e enterotoxinas *estafilocócicas* em amostras de leite em pó

4.3.1 Pesquisa de *Enterobacteriaceae*

Para a análise microbiológica das 30 amostras de leite em pó, relativa à Diretiva 2073/2005 da União Européia, para análise de *Enterobacteriaceae* foram seguidas as metodologias em 3MTM PetrifilmTM *Enterobacteriaceae* e a norma ISO 21528-2:2004. Esta norma indica inoculação da amostra em VRBG, em dupla camada, e quando há presença de colônias características, são realizadas análises confirmatórias por testes de oxidase e fermentação de glicose. Neste caso, as colônias são repicadas do VRBG e/ou 3M Petrifilm *Enterobacteriaceae* e plaqueadas em ágar nutriente, as mesmas são incubadas por 37°C por 24h. Para o teste de oxidase, adiciona-se o Reagente de Oxidase (Difco, 3530) à colônia. Quando o resultado é

positivo, a colônia fica em cor violeta e em caso negativo, a cor não se altera. Foi utilizada como controle positivo, uma amostra de *Pseudomonas aeruginosa* do Laboratório de Microbiologia de Leite do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG. Também foi testada uma fita reagente de oxidase (Laborclin). Para as colônias oxidase-negativo, realizou-se o teste de fermentação da glicose, isolando as colônias do Ágar nutriente e estriando em tubos contendo Ágar glicose com indicador vermelho de bromo-cresol. Então incubou-se por 37°C por 24h e as colônias de *Enterobacteriaceae* apresentam um halo amarelado (HPA, 2004).

4.3.2 Pesquisa de *Staphylococcus* spp.

Para as análises de *Staphylococcus* spp. foram utilizadas as placas 3M™ Petrifilm™ *Staph Express* por inoculação de 1mL das diluições 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ e posterior incubação a 36 °C ± 1 por 24h. Para efeito de contagem, consideraram-se as colônias vermelho-violetas como *Staphylococcus aureus*. Quando havia a presença de colônias azuis-esverdeadas e ou pretas nas placas 3M Petrifilm, aplicou-se o disco de DNA contendo o corante azul de ortotoluidina, que acompanha o kit 3M™ Petrifilm™ *Staph Express*, para teste da DNase. As placas Petrifilm que tinham colônias consideradas atípicas foram abertas e o disco de DNA foi inserido e então incubou-se a 36 °C ± 1 por 3h. As colônias confirmadas foram as que apresentaram um halo rosado em torno da colônia.

Para contagem de *Staphylococcus*, também foi utilizada a metodologia oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003) que está alinhada com a metodologia ISO 6888 parte 1, para *Staphylococcus* coagulase positivo.

Realizou-se a diluição das amostras pesando-se 25g ± 0,2 em 225mL de água

salina peptonada 0,1%. Então foram preparadas as diluições 10⁻¹ (três placas contendo 0,4; 0,3 e 0,3mL) e 10⁻² (0,1mL da diluição 10⁻¹). Conforme resultados obtidos anteriormente em um pré-teste, não foi necessário realizar as diluições posteriores. Adicionou-se ao meio Baird-Parker (ISOFAR, 2122), suspensão com gema de ovo 50% enriquecido com telurito 0,1% (Laborclin, 520089), sendo que esta suspensão representa 5% do volume total do meio. Então fez-se a semeadura das amostras em placas secas contendo este meio preparado anteriormente. Com auxílio da alça de Drigalski realizou-se o espalhamento da amostra até completa absorção pelo Ágar. Incubaram-se as placas invertidas a 36 ± 1 °C por 48h. Selecionaram-se as placas com contagem entre 20 e 200 e realizou-se a contagem diferenciando as colônias típicas (T - negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio) e atípicas (A - acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos). Selecionaram-se de três a cinco colônias T e A e cada colônia foi semeada em tubos contendo o meio Brain Heart Infusion (BHI) – (Acumedia, 7116A) e os tubos foram incubados a 36 °C ± 1 por 24h. Após, 0,3mL do cultivo em BHI foi transferido para um tubo contendo 0,3mL de plasma de coelho (Laborclin, 570204) e o material foi incubado a 36 ± 1 °C por 6h. Após este período, observou-se a formação de coágulo, conforme critérios abaixo:

- Reação negativa: ausência de coágulo
- Reação 1+: coágulo pequeno e desorganizado
- Reação 2+: coágulo pequeno e organizado
- Reação 3+: coágulo grande e organizado
- Reação 4+: coágulo de todo conteúdo do tubo, que não se desprende quando o tubo é invertido.

Como controle positivo, foram utilizadas cepas de *S. aureus* do laboratório de Microbiologia do Leite do Departamento

4.3.3 Detecção de enterotoxinas estafilocócicas

A pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas foi realizada em 30 amostras de leite em pó utilizando o kit 3M Tecra Staph Enterotoxins Visual Immunoassay (3M EUA) citado por LANCETTE e BENNETT (2001) que detecta as toxinas A, B, C1, C2, C3, D e E. Para tal, foi feita a reconstituição do leite em pó, numa diluição de 1:10, checado o pH que deve estar entre 7 e 8 e então, procedeu-se o teste de ELISA. O limite de detecção do kit é 1ng (3M EUA). As análises de enterotoxinas de *Staphylococcus* foram realizadas em duas etapas, sendo processadas 15 amostras em cada uma. Em cada etapa foram realizados os controles positivo e negativo, que acompanham o kit. Os poços utilizados para análise continham os anticorpos das enterotoxinas acima citadas. Antes da realização da análise pela metodologia ELISA, adicionaram-se 50 µL do aditivo 10 do kit a 1mL de amostra para então retirar uma alíquota de 200µL.

O procedimento ELISA foi realizado de acordo com as seguintes etapas:

Passo 1: Alocou-se o número de poços no suporte de acordo com o número de amostras mais 2 extras para os controles.

Passo 2: Adicionou-se a solução de lavagem (kit) nos poços e a deixou em temperatura ambiente por dez minutos.

de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

Passo 3: Adicionaram-se em cada poço, 200µL da amostra correspondente e o mesmo volume para os controles positivo e negativo. Cobriu-se o suporte com filme plástico e o incubou por 2h de 35 a 37°C.

Passo 4: Primeira lavagem – descartou-se a amostra em solução de hipoclorito de sódio 2%. Para certificar que os poços estavam vazios, bateu-se o suporte contra papel-toalha. Então, adicionou-se a solução de lavagem nos poços e, após, a mesma foi descartada na solução de hipoclorito de sódio 2%. Repetiu-se o processo num total de quatro vezes.

Passo 5: Adição do conjugado: Adicionaram-se 200µL do conjugado (kit) em cada poço e então os incubou por 1h em temperatura ambiente (25 °C).

Passo 6: Segunda lavagem – repetiu-se o processo conforme Passo 4, porém cinco vezes.

Passo 7: Adição do substrato – Adicionaram-se 200µL do substrato (kit) em cada poço e então os incubou por, no mínimo, 30 minutos em temperatura ambiente (25 °C). Então, fez-se a leitura do resultado, conforme cartão de leitura. O controle positivo precisava estar verde conforme o número 4 ilustrado na Figura 4 abaixo. As amostras são consideradas negativas se estiverem entre 1 e 2 e positivas se 3, 4 ou 5.

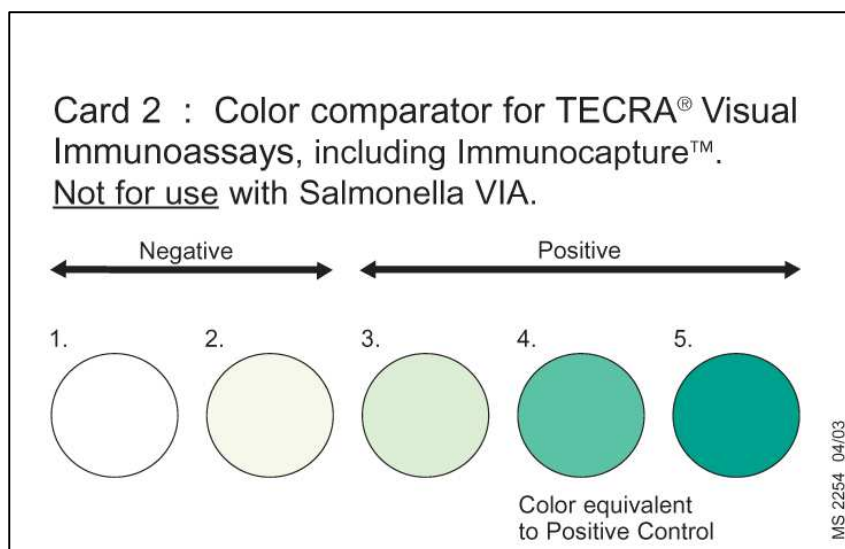


Figura 4. Cartão de leitura do kit de detecção de enterotoxinas de *Staphylococcus*.
Fonte: 3M EUA

5 Análise Estatística

O experimento foi realizado utilizando-se o delineamento em blocos ao acaso. A resposta medida foi a contagem de *Enterobacteriaceae* e *S. aureus* (3M Petrifilm) e de *Staphylococcus* coagulase positivo (Brasil, 2003) em UFC por g ou cm^2 , dependendo da amostra. Para análise de enterotoxinas estafilocócicas (SE), o resultado foi expresso em presença ou ausência. Neste caso, os resultados foram submetidos ao teste de Qui-Quadrado.

Para o tratamento estatístico, os dados foram submetidos a transformação logarítmica, com a função $\log_{10}(\text{valor} + 1)$. Foi somado 1 a todos os resultados, pois alguns valores foram ausência (zero), quando não é possível realizar a transformação logarítmica. Esse processo foi utilizado para aproximar os dados para uma distribuição normal.

Na primeira etapa do experimento, foi realizado um delineamento em blocos ao acaso, em esquema fatorial 5×2 , com

parcelas subdividas. Os cinco pontos de coleta (leite cru, leite pasteurizado, leite em pó, *swab* de manipulador e *swab* de equipamento) foram analisados em dois tratamentos (com e sem pré-enriquecimento). Após, os tratamentos foram submetidos à análise pelo 3M Petrifilm *Enterobacteriaceae* e pelo meio de cultura VRBG (subparcelas). Para análise comparativa entre os pontos de coleta, utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de teste de comparações múltiplas. A análise estatística de *Enterobacteriaceae* no ar foi realizada à parte, uma vez que não passou pelos processos de pré-enriquecimento e foi realizada com apenas uma metodologia.

Na segunda etapa do experimento, também foi utilizado delineamento em blocos ao acaso utilizando o teste não-paramétrico de Wilcoxon com significância estatística definida de $p < 0,05$.

O delineamento seguiu metodologia proposta por Sampaio (2007) e os resultados foram analisados pelo Programa Minitab®14.0 e SAS®.

6. Resultados e Discussão

6.1 Monitoramento de *Enterobacteriaceae* na linha de processamento de leite em pó

6.1.1 Pesquisa de *Enterobacteriaceae* na cadeia de produção de leite em pó.

Colônias de *Enterobacteriaceae* foram identificadas utilizando-se o meio VRBG e nas placas 3M Petrifilm *Enterobacteriaceae* (Figura 5).



Figura 5. Colônias de *Enterobacteriaceae* no meio VRBG e nas placas 3M Petrifilm *Enterobacteriaceae*.

Inicialmente, buscou-se avaliar se havia diferença significativa na contagem de *Enterobacteriaceae* (ISO 21528:2 e 3M Petrifilm) quando as amostras foram submetidas ou não ao pré-enriquecimento. Conforme a Tabela 1, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na contagem de colônias quando as amostras foram submetidas ao pré-enriquecimento, em ambas metodologias. Não foram encontrados trabalhos na literatura científica que avaliassem a variação na contagem de *Enterobacteriaceae* em relação ao pré-enriquecimento. Apenas

Sperber et al. (2001) citaram que o pré-enriquecimento seguido de enriquecimento seletivo para *Salmonella* spp. implica no aumento da população inicial. A utilização da metodologia ISO 21528:1 para um pré-enriquecimento não seletivo não implica em variação significativa na população inicial, considerando o binômio 18h / 37°C. Sendo assim, o pré-enriquecimento é indicado mesmo para produtos em que são pesquisados dados quantitativos, sobretudo os que sofreram tratamentos térmicos mais drásticos, o que facilitaria a recuperação células microbianas injuriadas.

Tabela 1. Médias de contagens de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL), nas cinco amostras, submetidas ou não a pré-enriquecimento

Pré - Enriquecimento	N	Pré - enriquecimento	<i>Enterobacteriaceae</i>	
			Petrifilm	VRBG
COM	35	Média	1,71840 ^a	1,81966 ^b
		Desvio Padrão	2,85811	2,84846
SEM	35	Média	1,15389 ^a	1,145856 ^b
		Desvio Padrão	2,20052	2,22833
Teste de Wilcoxon (p - valor)			0,21530	0,08545

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ($p > 0,05$)

Ainda em relação ao pré-enriquecimento, quando foram consideradas as 35 amostras (5 pontos de coleta em sete períodos), não foi detectada diferença significativa entre elas quando passaram ou não pelo pré-enriquecimento, ao nível de 5% de significância. Porém, quando foi realizada a mesma análise por ponto de coleta, observou-se diferença significativa para amostras de leite cru que passaram por pré-enriquecimento ($P < 0,05$). Para as demais amostras, não houve diferença significativa na contagem de *Enterobacteriaceae* ($p > 0,05$). Para o leite cru, a contagem média

foi de $4,85 \times 10^5$ UFC/mL no 3M Petrifilm e $6,88 \times 10^5$ UFC/mL no VRBG. Para os demais quatro pontos de coleta, a contagem máxima foi de $1,35 \times 10^2$ UFC/amostra para *swab* de superfície da mão do manipulador. Isto sugere que para populações iniciais elevadas, o pré-enriquecimento influi significativamente na contagem final. As Tabelas 2 (3M Petrifilm) e 3 (VRBG) demonstram os resultados estatísticos desta observação e comprovam que esta diferença no leite cru foi identificada nos dois métodos de análise.

Tabela 2. Médias de contagens de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL), em amostras de leite cru, pasteurizado, em pó e na superfície de equipamento e da mão de manipulador usando-se o meio 3M Petrifilm, com e sem pré-enriquecimento

Estatística	Leite cru		Leite pasteurizado		Leite em pó		Swab equip.		Swab mão	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Média	5,40 ^a	6,99 ^b	0,0 ^c	0,34 ^c	0,07 ^d	0,19 ^d	0,00 ^e	0,47 ^e	0,30 ^f	0,60 ^f
Desvio Padrão	0,659	0,691	0,000	0,902	0,180	0,500	0,000	1,230	0,806	1,600
p - valor	0,001 (t de Student)		1,00 (Wilcoxon)		0,567 (t de student)		1,00 (Wilcoxon)		0,666 (t de student)	

Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$)

Tabela 3. Médias de contagens de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL), em amostras de leite cru, pasteurizado, em pó e na superfície de equipamento e da mão de manipulador usando-se o meio VRBG, com e sem pré-enriquecimento

Estatística	Leite cru		L. pasteurizado		Leite em pó		Swab Equip.		Swab Manip.	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Média	5,45 ^a	7,01 ^b	0,0 ^c	0,64 ^c	0,00 ^d	0,30 ^d	0,00 ^e	0,47 ^e	0,28 ^f	0,68 ^f
Desvio Padrão	0,741	0,818	0,000	1,097	0,000	0,803	0,000	1,244	0,753	1,592
p - valor	0,003 (t de student)		0,371 (Wilcoxon)		1,00 (Wilcoxon)		1,00 (Wilcoxon)		0,566 (t de student)	

Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$)

Em seguida, foi realizada uma comparação entre os métodos VRBG e 3M Petrifilm para os diferentes pontos de coleta. De acordo com a Tabela 4 (para as amostras que não foram pré-enriquecidas) considerando-se os cinco pontos de coleta

diferentes, houve equivalência entre os dois métodos na recuperação de *Enterobacteriaceae*. Pela Tabela 5, pode-se observar que não houve diferença na detecção de *Enterobacteriaceae* quando foi realizado o pré-enriquecimento ($p > 0,05$).

Tabela 4. Comparação dos métodos 3M Petrifilm (PF) e VRBG na detecção de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL), em amostras de uma indústria de laticínios de Minas Gerais, sem pré-enriquecimento

Estatística	Leite cru		L. pasteurizado		Leite em pó		Swab Equip.		Swab Manip.	
	PF	VRBG	PF	VRBG	PF	VRBG	PF	VRBG	PF	VRBG
Média	5,40 ^a	5,45 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	0,07 ^c	0,0 ^c	0,0 ^d	0,0 ^d	0,30 ^e	0,28 ^e
Desvio Padrão	0,659	0,741	0,0	0,0	0,180	0,0	0,0	0,0	0,806	0,753
p - valor	0,899 (t de student)		-		1,00 (Wilcoxon)		-		0,962 (t de student)	

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si ($p > 0,05$)

Tabela 5. Comparação dos métodos 3M Petrifilm (PF) e VRBG na detecção de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL), em amostras de uma indústria de laticínios de Minas Gerais, com pré-enriquecimento

Estatística	Leite cru		L. pasteurizado		Leite em pó		Swab Equip.		Swab Manip.	
	PF	VRBG	PF	VRBG	PF	VRBG	PF	VRBG	PF	VRBG
Média	6,99 ^a	7,01 ^a	0,34 ^b	0,64 ^b	0,19 ^c	0,30 ^c	0,47 ^d	0,47 ^d	0,60 ^e	0,68 ^e
Desvio Padrão	0,691	0,818	0,902	1,097	0,500	0,803	1,230	1,244	1,600	1,592
p - valor	0,968 (t de student)		0,590 (t de student)		0,754 (t de student)		0,994 (t de student)		0,933 (t de student)	

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si ($p > 0,05$)

Com a finalidade de identificar as possíveis fontes de contaminação por *Enterobacteriaceae*, foi realizado teste de Kruskal-Wallis para fazer comparações entre os pontos de coleta. De acordo com a Tabela 6, percebe-se que tanto pela

metodologia tradicional como pelo 3M Petrifilm houve diferença significativa ($p < 0,05$), o que demonstra que há diferença na contagem de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL) entre os pontos.

Tabela 6. Comparação dos resultados de detecção de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL) em amostras de uma indústria de leite em pó de Minas Gerais, utilizando-se o meio 3M Petrifilm e o meio VRBG

Ponto de coleta	Contagem média (\log_{10} (UFC + 1)/mL ou g ou cm ²)	
	Petrifilm	VRBG
Ponto 1 – Leite Cru	6,19449	6,22706
Ponto 2 – Leite Pasteurizado	0,17040	0,31894
Ponto 3 – Leite em pó	0,12852	0,15170
Ponto 4 – Swab de equipamento	0,23254	0,23518
Ponto 5 – Swab de manipulador	0,45475	0,48094
N	14 (por ponto de coleta)	14 (por ponto de coleta)
H _{cal}	33,247	33,461
Qui _{tab}	9,49	9,49

H_{cal} > Qui_{tab} – há diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$)

Como houve diferença significativa entre as contagens de *Enterobacteriaceae* considerando-se os diferentes pontos de coleta, foi feita a análise comparando-os entre si (Tabelas 6, 7, 8 e 9). Identificar as possíveis fontes de contaminação é imprescindível para a adoção de medidas corretivas e prevenção de perigos e riscos.

Quando se fixou o ponto de coleta leite cru e o comparou com os demais, verificou-se diferença na contagem de *Enterobacteriaceae* ($p < 0,001$). Porém, quando se realizaram as comparações múltiplas entre os pontos leite cru e leite pasteurizado e leite em pó, não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Isto

permite inferir que o primeiro processo térmico na elaboração do leite em pó (pasteurização) reduziu significativamente a população inicial de *Enterobacteriaceae* e que os processos seguintes bem como equipamentos e manipuladores não contaminaram o produto. De acordo com estes dados, é possível inferir que o leite cru é a principal fonte de *Enterobacteriaceae* na linha de processamento. Posto isto, pesquisas de identificação da fonte destes microrganismos no campo são importantes.

Visto que a pasteurização é eficiente na redução da contagem de *Enterobacteriaceae* no leite cru, é importante o monitoramento deste processo como ponto crítico uma vez que se houver falha, não haverá redução adequada na microbiota. Os resultados foram estatisticamente equivalentes para os quatro tratamentos (3M Petrifilm, com e sem pré-enriquecimento e VRBG, com e sem pré-enriquecimento).

Tabela 7. Comparação múltipla dos resultados de detecção de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL) em amostras de uma indústria de leite em pó de Minas Gerais, utilizando-se o meio 3M Petrifilm sem pré-enriquecimento

	Leite cru	Leite past.	Leite em pó	Swab equip.	Swab manip.
Leite cru	1				
Leite Past.	P < 0.001	1			
Leite em pó	P < 0.001	P > 0.05	1		
Swab equip.	P < 0.001	P > 0.05	P > 0.05	1	
Swab manip.	P < 0.001	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	1

Tabela 8. Comparação múltipla dos resultados de detecção de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL) em amostras de uma indústria de leite em pó de Minas Gerais, utilizando-se o meio 3M Petrifilm com pré-enriquecimento

	Leite cru	Leite past.	Leite em pó	Swab equip.	Swab manip.
Leite cru	1				
Leite Past.	P < 0.001	1			
Leite em pó	P < 0.001	P > 0.05	1		
Swab equip.	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05	1	
Swab manip.	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	1

Tabela 9. Comparação múltipla dos resultados de detecção de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL) em amostras de uma indústria de leite em pó de Minas Gerais, utilizando-se o meio VRBG sem pré-enriquecimento

	Leite cru	Leite past.	Leite em pó	Swab equip.	Swab manip.
Leite cru	1				
Leite Past.	P < 0.001	1			
Leite em pó	P < 0.001	P > 0.05	1		
Swab equip.	P < 0.001	P > 0.05	P > 0.05	1	
Swab manip.	P < 0.001	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	1

Tabela 10. Comparação múltipla dos resultados de detecção de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL) em amostras de uma indústria de leite em pó de Minas Gerais, utilizando-se o meio VRBG com pré-enriquecimento

	Leite cru	Leite past.	Leite em pó	Swab equip.	Swab manip.
Leite cru	1				
Leite Past.	P < 0.001	1			
Leite em pó	P < 0.001	P > 0.05	1		
Swab equip.	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05	1	
Swab manip.	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	1

Em estudo realizado por Eneroth et al. (1998), em plantas processadoras de leite na Noruega e Suécia, os autores também comprovaram que o processo de pasteurização é eficiente na redução da população inicial de *Enterobacteriaceae*, reduzindo-se as contagens de 5×10^2 (silos) para valores < 10 UFC/mL.

Nas amostras de *swab* de manipuladores, houve recuperação de *Enterobacteriaceae* em apenas 14,3%, número baixo comparado ao estudo de Lues e Tonder (2007) que encontraram 44% de positividade. Para análises de *swabs* de superfícies de equipamento, não foram encontradas referências na literatura a respeito de *Enterobacteriaceae*. Vale ressaltar que a utilização de *swabs* para enumeração de microrganismos, de maneira geral, não são regulamentados pela legislação, ou seja, normalmente não há padrões legais estabelecidos. No entanto,

eles são ferramentas internas importantes de monitoramento da qualidade. Em *swabs* de equipamentos, no presente estudo, *Enterobacteriaceae* foram identificadas apenas em amostras que foram incubadas a 37°C por 18h em água peptonada 0,1% (pré-enriquecimento). As contagens foram de 18 a $19,6 \times 10$ UFC/cm². As mesmas amostras antes do pré-enriquecimento não apresentaram contagem nos dois métodos pesquisados. Isto denota a importância desta etapa de pré-enriquecimento para amostras de *swab* de equipamentos, pois após os procedimentos de higienização, quando são utilizados detergentes seguidos da aplicação de sanitizantes, as células microbianas podem morrer ou ficarem injuriadas. Assim, a inoculação destas células diretamente ao meio seletivo, sem um pré-enriquecimento, pode não ser eficiente na recuperação microbiana.

6.1.2 Pesquisa de *Enterobacteriaceae* no ambiente

Conforme recomendação da APHA (Marshall (1993) citado por Evancho et al. (2001)), a análise de ambiente foi realizada com placa com diâmetro de 90mm e exposta ao ambiente por 15 minutos na presença de meio seletivo para *Enterobacteriaceae* VRBG. Durante os sete períodos amostrados, foram seis pontos de ausência/cm² e em apenas um dia de análise foram recuperadas duas colônias na placa o que corresponde a 0,03UFC/cm². Este cálculo foi realizado pela divisão do número de colônias pela área de exposição da placa, considerando o diâmetro de 90mm. Considerando a baixa incidência de recuperação de *Enterobacteriaceae*, o ar não apresenta risco de contaminação do produto aliado ao fato que o processo produtivo é, sobretudo, fechado em tubulações e torres de secagem.

6.2 Monitoramento de *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus spp.* e enterotoxinas estafilocócicas em amostras de leite em pó

6.2.1 Pesquisa de *Enterobacteriaceae*

Na Tabela 11, têm-se os dados do teste de Wilcoxon para a comparação dos métodos VRBG (ISO 21528:2) e 3M Petrifilm *Enterobacteriaceae* em amostras de leite em pó. Notou-se que os resultados foram similares ($p > 0,05$) e que tanto o método 3M Petrifilm e VRBG detectaram estes microrganismos em leite em pó. Entre as duas amostras com resultado positivo (6,7%), apenas uma não atendeu a Diretiva 2073/2005 da União Européia, pois apresentou contagem de 20 UFC/mL, quando os limites são $m = M = 10$ UFC/mL.

Iversen e Forsythe (2004), ao avaliarem fórmulas infantis desidratadas à base de leite em pó, encontraram 8,5% de positividade para *Enterobacteriaceae* das 82 amostras analisadas, resultado similar ao desse trabalho. Estuningsih et al.. (2006) encontraram 47% de positividade para *Enterobacteriaceae* em fórmulas infantis desidratadas à base de leite em pó. Ahmed e Anwar (2006) pesquisaram presença de coliformes totais e *Salmonella sp.* em 55 amostras de leite em pó e encontraram resultados de < 3NMP e ausência em 25 g, respectivamente. Vale ressaltar que coliformes e *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, porém esta engloba um número maior de microrganismos.

Tabela 11. Contagens médias de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} (UFC +1)/g ou mL) em 30 amostras de leite em pó de uma indústria de Minas Gerais pelo meio 3M Petrifilm e VRBG

Estatística	<i>Enterobacteriaceae</i> - \log_{10} (UFC + 1)	
	VRBG	Petrifilm
Média	0,035 ^a	0,044 ^a
Desvio-padrão	0,190	0,241
N	30	30
Teste de Wilcoxon (p-valor)		1,000

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$)

Para as amostras que tiveram resultado positivo para *Enterobacteriaceae* (Amostra 19 – método ISO 21528:1 e Amostra 21 – método 3M Petrifilm), foram

realizados os testes bioquímicos recomendados (glicose e oxidase). O resultado para o teste de glicose foi positivo para todas as colônias, o que está de acordo

com as características da família *Enterobacteriaceae*. Na Figura 6, tem-se o resultado para a amostra 21. Para colônias

glicose negativo, não haveria alteração na cor do meio.

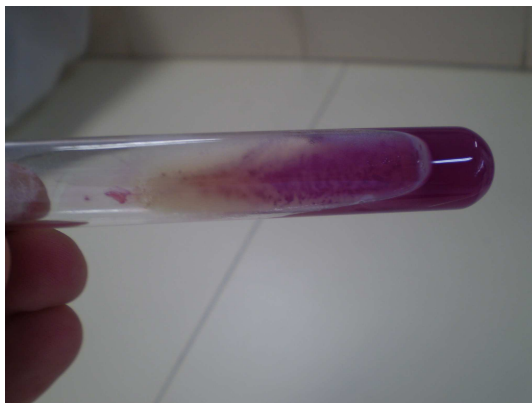


Figura 6. Resultado do teste de fermentação de glicose de amostra de leite em pó positiva para *Enterobacteriaceae*.

Em seguida, foram isoladas colônias para o teste de oxidase, sendo que foram utilizados os controles negativo (*Salmonella*) e positivo (*Pseudomonas*). Para as colônias isoladas, as amostras apresentaram-se como oxidase-negativo, com aspecto similar ao controle negativo mostrado na Figura 7. O controle positivo é apresentado na Figura 8. Para o teste de

oxidase pelo método da Laborclin, o resultado foi coerente com o anterior, sendo que na Figura 9 tem-se à direita o resultado do controle negativo, à esquerda tem-se o controle positivo e ao centro o resultado de uma colônia de *Enterobacteriaceae* isolada de uma amostra de leite em pó (Amostra 19).

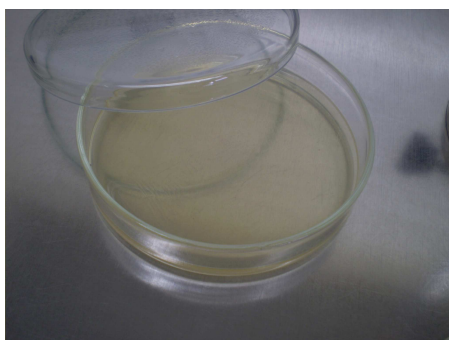


Figura 7. Teste de oxidase (Oxoid): controle negativo de *Salmonella* sp.

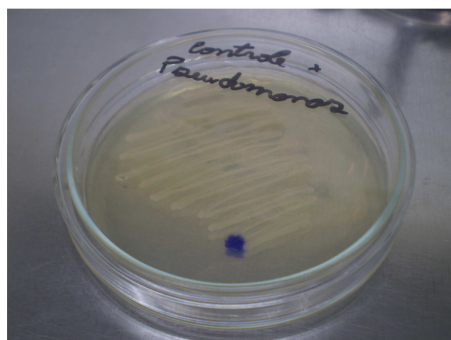


Figura 8. Teste de oxidase (Oxoid) – controle positivo utilizando-se amostra de *Pseudomonas* sp.

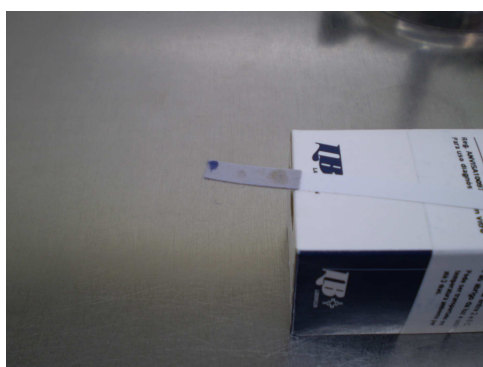


Figura 9. Teste de oxidase da Laborclin de amostra de leite em pó (esquerda: controle positivo e a direita controle negativo. Ao centro, Amostra 19 – leite em pó)

6.2.2 Pesquisa de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase positivo

Na Tabela 11 têm-se os resultados da análise estatística de *S. aureus* pelo 3M Petrifilm Staph Express e *Staphylococcus* coagulase positivo pelo método Brasil (2003). De acordo com o teste de Wilcoxon, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois métodos avaliados, sendo que houve contagem nas placas 3M Petrifilm Staph Express para *S. aureus* e pela metodologia descrita em Brasil (2003) não houve nenhuma amostra *Staphylococcus* coagulase positivo. Tal fato

pode ser explicado pelo fato de o meio 3M Petrifilm enumerar *S. aureus* e a metodologia tradicional *Staphylococcus* coagulase positivo. De acordo com Veras (2008) muitas cepas de *Staphylococcus* spp. apresentam o gene da coagulase porém não o expressam fenotipicamente. Mas de acordo com a Diretiva 2073/2005 da União Européia, todas as amostras estão em conformidade com o padrão legal e também atendem aos requisitos técnicos de Identidade e Qualidade do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1996).

Tabela 12. Contagem média de *Staphylococcus* spp. (\log_{10} (UFC + 1)/g) de leite em pó utilizando-se a metodologia tradicional e o meio 3M Petrifilm

Estatística	<i>Staphylococcus</i> – \log_{10} (UFC + 1)	
	Petrifilm STX	Coagulase positivo
Média	0,566 ^a	0 ^b
Desvio-padrão	0,634	0
N	30	30
Teste de Wilcoxon (p-valor)		0,001

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,01$)

Do total de 30 amostras analisadas, apenas três não apresentaram contagem no meio Baird-Parker e as demais apresentaram contagem média de $1,8 \times 10^2$ UFC/mL, entre típicas e atípicas que representaram 1,1 e 98,9% do total de colônias (525), respectivamente. Apenas uma amostra nesse meio teve contagem superior a 10^3 ($1,06 \times 10^3$), com 100% das colônias atípicas. As placas 3M Petrifilm Staph Express recuperaram *Staphylococcus aureus* em 46,7% das amostras, com média de $0,83 \times 10$ UFC/g, sendo que 100% delas atenderam a Diretiva 2073/2005 bem como a legislação Brasileira (Brasil, 1996). Em trabalho realizado com leite cru proveniente do sul do Brasil, também foi observada a predominância de colônias atípicas, independentemente da capacidade de produção da enzima coagulase. Porém, houve isolamento de colônias típicas e atípicas produtoras desta enzima no leite cru (Santana et al., 2006). Orden et al. (1992) citaram que um considerável percentual de colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus* coagulase negativo também podem ser capazes de produzir enterotoxinas. Carmo (2001) também reforça sobre a importância das cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo em saúde pública.

Ahmed e Anwar (2006) obtiveram resultados entre $6,0 \times 10$ e $8,2 \times 10^2$ UFC/mL de *Staphylococcus* spp. em leite em pó, utilizando apenas o Ágar Baird-Parker, que foram superiores aos encontrados nesta pesquisa em ambas metodologias. Um dos fatores que justificam esta diferença está no fato de os

autores não terem realizado testes subsequentes como requerem a legislações Brasileira e Européia.

Em trabalhos realizados com leite cru nos EUA e no Brasil por Silva et al. (2005) e Cerqueira et al. (2007), respectivamente, e outro realizado por Tassinari et al. (2006) com amostras diversas, os autores mencionam a equivalência do 3M Petrifilm Staph Express com a metodologia padrão, sendo que em ambos os trabalhos foi citado que o 3M Petrifilm apresentou melhores resultados na enumeração de *Staphylococcus* spp. Silva et al. (2005) destacaram a importância do analista ser bem treinado na interpretação das colônias bem como do halo formado após o uso do disco de DNA e indicador (Sistema 3M Petrifilm Staph Express), quando realizado teste de reprodutibilidade entre analistas.

Ikeda et al. (2005), em uma avaliação de surto de intoxicação alimentar, comprovaram que a causa era enterotoxinas estafilocócicas. No entanto, na análise do leite em pó desnatado em que foi comprovada a presença das enterotoxinas, não havia células viáveis de *Staphylococcus aureus*. Neste estudo foram detectadas apenas células mortas em análise de PCR em tempo real, o que reforça a termo-sensibilidade deste microrganismo e termo-estabilidade das enterotoxinas bem como que sua presença no produto após processamento térmico pode indicar falhas neste processo ou contaminação pós-processo.

Na análise de *Staphylococcus* pelo método 3M Petrifilm Staph Express, as

placas que apresentaram apenas colônias vermelho-violetas foram consideradas na contagem e quando houve colônias atípicas (azuis-esverdeadas e/ou pretas) foi utilizado um disco de DNA com indicador, conforme

recomendado pelo fabricante. Neste caso, a formação de um halo rosado em volta da colônia confirma o resultado, pelo teste da DNase (Figura 10).

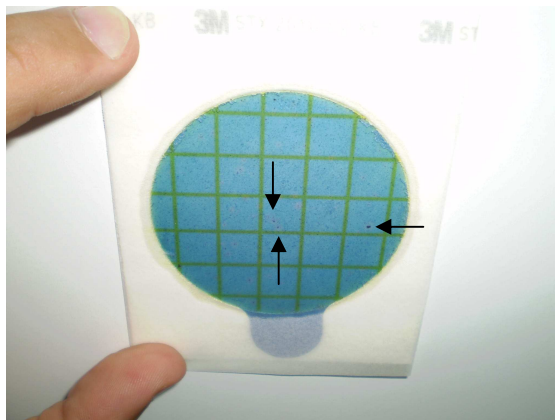


Figura 10. Teste da DNase pelo 3M Petrifilm Staph Express realizado em amostras de leite em pó de uma indústria de laticínios de Minas Gerais.

6.2.3 Análise de Enterotoxinas de *Staphylococcus spp.*

Na Figura 11, tem-se o suporte contendo as 15 primeiras amostras avaliadas e também os controles positivo e negativo. Nota-se que os primeiros 16 poços, sendo 15 de amostras e o seguinte do controle negativo ficaram incolor e o 17º poço com coloração esverdeada, equivalente a cor número 4, controle positivo, conforme recomendação do fabricante.

Do total de 30 amostras de leite em pó analisadas, todas apresentaram resultado negativo para enterotoxinas estafilocócicas. O resultado está de acordo com o estudo de Harvey e Gilmore (1990) em experimento realizado em amostras de leite em pó na Irlanda do Norte. Porém, Ikeda et al. (2005) atribuíram a etiologia de um surto no Japão no ano 2000 às enterotoxinas estafilocócicas presentes em leite em pó desnatado reconstituído. Constatação

interessante foi observada por Borges et al. (2008) que analisaram a presença de *Staphylococcus* e suas enterotoxinas em queijo coalho. Estes autores detectaram a presença de enterotoxinas no queijo (produto final) apenas quando as enterotoxinas estavam presentes no leite cru. Todas as amostras de produto acabado contaminadas eram provenientes de leite cru previamente contaminado com as enterotoxinas, indicando que sua produção não ocorreu durante o processamento.

Os dados desta pesquisa também foram confrontados com os resultados da indústria fabricante do leite em pó que também monitora enterotoxinas estafilocócicas. A empresa não tem histórico de presença de enterotoxinas. Portanto, para este parâmetro, a indústria atende a legislação da União Européia.

7 Considerações Finais

Todas as espécies da família *Enterobacteriaceae* são potencialmente de interesse para indústria de laticínios, particularmente as espécies lactose-negativo, que não estão incluídas entre os coliformes e por isto, torna a análise de *Enterobacteriaceae* mais completa do ponto de vista higiênico-sanitário.

A realização de testes ambientais para *Enterobacteriaceae* em áreas de processo pode constituir um instrumento útil para a identificação e prevenção da presença de microrganismos patogênicos nos alimentos. As empresas que exportam produtos lácteos para União Européia e Japão já utilizam a análise de *Enterobacteriaceae* como indicador de qualidade higiênico-sanitária.

Embora no Brasil a legislação ainda não contemple esta análise, empresas devem atentar para tal fato, pois tem se tornado uma tendência mundial a exigência de pesquisa de *Enterobacteriaceae* em alimentos em geral.

8 Conclusões

O método rápido que utiliza o meio 3M Petrifilm *Enterobacteriaceae* é uma alternativa adequada para a indústria, uma vez que facilita os procedimentos analíticos, contempla menos etapas de análise, é mais rápido e apresenta a mesma eficiência que a metodologia tradicional.

A contaminação por *Enterobacteriaceae* na cadeia de produção do leite em pó da indústria avaliada provém da matéria-prima (leite cru) e o processo tecnológico reduz e mantém os níveis microbiológicos dentro dos padrões da União Européia. É importante, sobretudo, trabalhar no campo para melhorar a qualidade do leite e reduzir a população inicial de *Enterobacteriaceae* que se apresentou bastante elevada. São

necessários estudos detalhados no campo para averiguação da fonte destes microrganismos para se realizar um controle efetivo na contaminação.

A etapa de pré-enriquecimento não seletivo é interessante na recuperação de *Enterobacteriaceae* em produtos e locais que apresentam uma população inicial baixa como, por exemplo, o leite em pó e a superfície de equipamentos higienizados.

O 3M Petrifilm *Staph Express* é uma ferramenta adequada na enumeração de *S. aureus*, inclusive pelo fato de na metodologia tradicional, várias colônias típicas e atípicas serem isoladas e não expressarem a produção da enzima coagulase. Diversos trabalhos vêm demonstrando a importância epidemiológica das cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, como potencialmente produtoras de enterotoxinas. Porém, atualmente, nem no Brasil nem na União Européia são contempladas essas análises, somente as de *Staphylococcus* coagulase positivo. Isto denota a importância da revisão das legislações vigentes visando à pesquisa de *Staphylococcus* spp. e não somente *Staphylococcus* coagulase positivo, uma vez que as cepas podem conter o gene da enzima coagulase mas não expressarem.

9 Referências Bibliográficas

- Ahmed, S., Anwar, M. N. Microbial Counts of Dried Powder Milk Available in Local Markets of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 23 (2), p 162-164, 2006.
- Altekruse, S.F., Cohen, M.L., Swerdlow, D.L. Emerging foodborne diseases. *Emerging Infect Diseases*. 3, 285-293, 1997.

- Balaban, N., Rasooly, A. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*. V. 61, p. 1–10, 2000.
- Bergdoll, M.S. Enterotoxins. In: *Staphylococci and Staphylococcal infections* (Easman, C.S.F. e Adlam, C., eds.). Academic Press, pp. 559-598. Reino Unido, 1983.
- Borges, M. F.; Nassu, R. T.; Pereira, J. L.; Andrade, A. P. C.; Kuaye, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. *Ciência Rural*, v.8, n. 5, p. 1431 – 1438. 2008
- Brenner D.J., Farmer III J.J. Family I. *Enterobacteriaceae*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds, DJ Brenner, NR Krieg, and JT Staley. vol 2. New York Springer, pp 587–850, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Leite em Pó. 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 62: “Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água”. Coordenação Geral de Laboratório Animal, 2003.
- British Standards Institution. BS 5763 : 1993, ISO 7402 : 1993. Microbiological examination of food and animal feeding stuffs. Part 10. Enumeration of Enterobacteriaceae. London : BSI, 1993
- CARMO, L.S. *Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC2, SED e TSST-1 para uso em ensaios imunoenzimáticos*. 2001. 254f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Cerqueira, M. M. O. P.; Martens, N. E.; Pacheco, J.; Souza, M. R.; Penna, C. F. A. M.; Fonseca, L. M.; Rodrigues, R.; Leite, M. O.; Clinquart, D. L. e Tassinari, A. R. Evaluation of 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count System for *Staphylococcus* spp. Detection in Individual Cow Milk Samples. *International Association of Food Protection*. 94th Annual Meeting. P3 – 72, p. 194, 2007.
- Dancer, G. *Enterobacter sakazakii*. Washington State University. Disponível em <http://courses.ag.uidaho.edu/fst/fstmmbb416/November30%202004%20Enterobacter%20sakazakii%20III.pdf>. Consultado em 18/02/2009.
- De Buyser, M. L. et al.. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. *International Journal of Food Microbiology*, v. 67, p. 1-17, 2001.
- Doyle, M. P. Foodborne Bacterial Pathogens. Ed. Marcel Dekker. New York, 1989.
- EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Estatísticas do Leite. Brasil, 2008. Consultado em www.cnpql.embrapa.br em 17/08/2008.
- Eneroth, A.; Christiansson, A.; Brendehaug, J; Molin, G. Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with Reference to the Psychrotrophic Spoilage Flora. *International Dairy Journal*, v.8, p.829 – 834, 1998.
- Estuningsih, S.; Kress, C.; Hassan, A. A.; Akineden, O.; Scheneider, E. e Usleber, E. Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula manufactured in Indonesia

- and Malaysia. *Journal of Food Protection*, v. 69, n. 12, p. 3013 – 3017. 2006
- Evancho, G.M., Sveun, W.H., Moberg, L.J. e Frank, J.F.. Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment In: Downes, F. P.; Ito, K. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed. APHA, 2001, p. 25-36
- Fagundes, H.; Oliveira, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciência Rural*, 34 (4) p. 1315-1320, 2004.
- Farzana, K. Shah, S. N. H.; Jabeen, F. Antibiotic Resistance Pattern Against Various Isolates of *Staphylococcus aureus* from raw milk samples. *Journal of Research Science*. 15 (2) p. 145-151, 2004.
- Ferreira, L. M.; Nader Filho, A.; Oliveira, E.; Zafalon, L. F.; Souza, V. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados em casos de mastite subclínica bovina. *Ciência Rural*, 36 (4), p-1228-1234, 2006.
- Forsythe, S. J. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Ed. Artmed. Porto Alegre, 2002.
- Franco, B. D. G. M.; Landgraf, M. *Microbiologia dos alimentos*. Editora Atheneu. 2003.
- Frontini, S. Clothing for the food industry. *Latte*. V.3: p. 52-55 1996.
- Garen, A. Filtration eliminates pathogens. Total Fluid Management from Pall Corporation. *Deutsche Milchwirtschaft*. V. 57 (14): 594 – 595, 2006.
- Gillio, C.M. *Enterobacter sakazakii* em fórmulas lácteas infantis desidratadas, para bebês de 0 - 6 meses. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.
- Haeghebaert, S. Le Querrec, F., Gallay, A., Bouvet, P., Gomez, M e Vaillant, V. Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000. *Bull, Épidémiologique Hebdo*. V. 23, p. 105-109, 2002.
- Harvey, J.; Gilmour, A. Isolation and identification of staphylococci from milk powders produced in Northern Ireland. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, p. 433 – 438, 1990.
- Health Protection Agency (2004). Enumeration of *Enterobacteriaceae* by the Colony Count Technique. National Standard Method F 23 Issue 1. Disponível em http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp. Consultado em 14/07/2008.
- Ikeda, T. Tamate, N., Yamaguchi, K. Makino, S. Mass Outbreak of Food Poisoning Disease Caused by Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins A and H. *Applied and environmental microbiology*. V. 71 (5). p. 2793–2795, 2005.
- Ikeda, T. Tamate, N., Yamaguchi, K. Makino, S. Quantitative Analysis of *Staphylococcus aureus* in Skimmed Milk Powder by Real-Time PCR. *Journal of Medicine Veterinary Science*. 67 (10) P. 1037–1041, 2005.
- ISO 21528-2:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony-count method. Switzerland, 2004.
- Iversen, C; Forsythe, S. Isolation of *Enterobacter sakazaki* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant

- formula milk and related products. *Food Microbiology*, v.21, n.6, p.771-777, 2004.
- Jornal Oficial da União Européia. Critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. Regulamento (CE) No. 2073 da Comissão. L 338 p. 3, 2005.
- Kornacki, J.L.; Johnson, J.L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In DOWNES, P.; ITO, K. eds. *Compendium of Methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed. Washington: APHA, 2001. p.69-82.
- Lamaita, H.C.; Cerqueira, M.M.O.P.; Carmo, L.S. et al. *Staphylococcus* spp. counting and detection of staphylococcal enterotoxins and toxic shock toxin syndrome from cooled raw milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, p.702-709, 2005
- Lancette, G.A., Bennett, R.W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: Downes, F. P.; Ito, K. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed. APHA, 2001, p. 387-403.
- Lawton, W.C. A comparison of 32oC e 35oC as incubation temperatures for the coliform count of milk and cream. *Journal of Milk Food Technology*. 18:288, 1955.
- Le Loir, Y. Baron, F., Gautier, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning : a review. *Genetics and Molecular Researchs*. V 2, p.63-76, 2003.
- Lues, J.F.R; Tonder, I. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. *Food Control*, v.4, p.326-332, 2007.
- Marshall, R.T. (ed.). *Standard Methods for the examination of dairy products*, 16th ed. APHA, Washington, 1992.
- Milkpoint. Brasil pode elevar exportação de lácteos. Disponível em <http://www.milkpoint.com.br/?actA=7&areaid=50&secaoID=165¬iciaID=36329>. Consultado em 21/04/2007.
- Mullane, N. R.; Murray, J.; Drudy, D. ; Prentice, N.; Whyte, P. Wall, P. G.; Parton, A. e Fanning, S. Detection of *Enterobacter sakazakii* in Dried Infant Milk Formula by Cationic-Magnetic-Bead Capture. *Applied Environmental Microbiology*. V. 72 n. 9, p.6325–6330. 2006
- Nazarowec – White, M.; Farber, J.M. Thermal resistance of *Enterobacter sakazaki* in reconstituted dried-infant formula. *Letters in Applied Microbiology*, v.24, n.1, p. 9-13, 1997.
- Oliveira, C. A. F.; Mestieri, L.; Santos, M. V.; Moreno, J. F. G.; Spers, A.; Germano, P. M. L. Effect of Microbiological Characteristics of Raw Milk on the Quality of Whole Milk Powder. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31 (2), 2000.
- Omoe, K. et al.. *Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in Staphylococcus aureus isolates*. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v.246, n.2, p.191-198, 2005.
- Onoue, Y., Mori, M. Amino acid requirement for growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in chemically defined media. *International Journal of Food Microbiology*. V 36. p. 77-82, 1997.
- Orden, J.A; Goyache, J.; Hernandez, J.; Domenech, A; Suarez, G.; Gomez-, E. L. Production of staphylococcal enterotoxin

- and TSST 1 by coagulase negative staphylococci isolated from ruminant mastitis. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 39, p. 144-148, 1992.
- Pearce, K. N. Milk Powder. Food Science Section, New Zealand Dairy Research Institute. Disponível em <http://www.nzic.org.nz/ChemProcesses/dairy/3C.pdf>. Consultado em 27/08/2008.
- Pereira, M.L.; Carmo, L.S.; Pereira, J. L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas em alimentos experimentalmente inoculados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, V 21(2) p.171-175. 2001
- Rapini, L.S; Teixeira, J. P.; Martins, N. E.; Cerqueira, M. M. O. P.; Penna, C. F. A. M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, V 56 (1), p.130-133, Belo Horizont, 2004.
- Rapini, L. S.; Cerqueira, M. M. O. P.; Carmo, L. S.; Veras, J. F.; Souza, M. R. Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, V. 57 (6), 2005.
- Richter, R.L., Vedamuthu, E.R. Milk and Milk Products. In DOWNES, P.; ITO, K. eds. Compendium of Methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. Washington: APHA, 2001. p.483 - 496.
- Robinson, R.K. (ed.). Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products, 3rd Edition. England, 2002.
- Sampaio, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3.ed. 265p. Belo Horizonte, 2007.
- Santana, A. S., Azeredo, D. R. P. Comparação entre o sistema Petrifilm RSA e a metodologia convencional para enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25 (3): 531-535, 2005.
- Santana, E. H. W.; Beloti, V.; Oliveira, T. C. R. M.; Moraes, L. B.; Tamanini, R. e Silva, W. P. Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina A, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. *Ciências Agrárias*, v. 27 (4), p. 639-646, 2006.
- Santos, C.D.M. *Staphylococcus* spp. e Enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia – MG: perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Dissertação de mestrado. UFU. Uberlândia, 2006
- Santos, M. V.; Fonseca, L. F. L. Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite. 1ed. São Paulo, 2007.
- Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, J.E., Zweifel, C., Stephan, R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Veterinary Microbiology*, v.101 p.101–107, 2004.
- Silva, B. O.; Caraviello, D. Z.; Rodrigues, A. C. e Ruegg, P. L. Evaluation of Petrifilm for the Isolation of *Staphylococcus aureus* from Milk Samples. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 3000 – 3008. 2005.
- Soejima, T.; Nagao, E.; Yano, Y.; Yamagata, H.; Kagi, H.; Shinagawa, K. Risk evaluation for staphylococcal food poisoning in processed milk produced with skim milk powder. *International Journal of Food Microbiology*. V 115 p. 29–34, 2007
- SOM 208 Microbiology. University of California. Microbiology Syllabus.

Disponível em http://www.ratsteachmicro.com/Enterobacteriaceae%20Notes/HCOE_CAI_Review_Notes_Enterobacteriaceae.htm. Consultado em 12/05/07.

Sperber, W.A. Moorman, M.A. Freier, T.A. Cultural Methods for the Enrichment and Isolation of Microorganisms. In DOWNES, P.; ITO, K. eds. Compendium of Methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. Washington: APHA, 2001. p.45 - 52.

Stencl, J. Water Activity of Skimmed Milk Powder in the Temperature Range of 20 – 45 °C. *Acta Veterinaria Brno*. V. 68 p. 209–215, 1999

Sveun, W.H.; Moberg, L.J.; Rude, R.A.; Frank, J.F. Microbiological monitoring of the food processing environment. In Vanderzant, C; Splittstoesser, eds. Compendium of Methods for the microbiological examination of foods. 3 ed. Washington: APHA, 1992. p. 51-71.

Tassinari, A. R.; Noda, P. K. Franco, G. M.; Landgraf, M e Destro, M. T. An evaluation of 3M Petrifilm Staph Express Count System for enumerating coagulase-positive *Staphylococcus*. *Food Quality*, v.54, p. 56-59, 2006.

Terra Viva Selectus. Leite em pó. Consultado em 17/09/08. Disponível em <http://www.terraviva.com.br/terraviva/selextus3075.html>

Veras J. F.; Carmo, L. S.; Tong, L. C.; Shupp, J. W.; Cummings, C.; Santos, D. A.; Cerqueira, M. M. O. P.; Cantini, A.; Nicoli, J. R.; Jett, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal Infectious Diseases*, 2008.

Wilson, I.G.; Cooper, J. E.; Gilmour, A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of *Staphylococcal* enterotoxin genes entB and entC1 and thermonuclease gene nuc. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, n. 6, p. 1793-1798, 1991.

Wong , A. C. L.; Bergdoll, M. S. Staphylococcal Food Poisoning. In: Cliver, D.; Riemann, H. *Foodborne diseases*. 2th ed. Amsterdam: Academic Press. p. 231-248, 2002.

Zink, D.L. *Enterobacteriaceae & the Food Plant Environment*. Minnesota, 1995. Disponível em www.arrowscientific.com.au/petrifilmentero.html. Acessado em 15/03/2007.

3M. “3M Petrifilm Staph Express Count System Interpretation Guide.” EUA, 2002. Consultado em 22/03/2008.

3M “ Quick Swab” <http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver>. EUA, 2003. Consultado em 12/03/2008.

3M. “3M Petrifilm Enterobacteriaceae Count System Interpretation Guide.” EUA, 2006. Consultado em 12/03/2008

3M. “3M Tecra Staph Enterotoxins Visual Immunoassay. Disponível em <http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver>. EUA, 2008. Consultado em 15/07/2008.