

ESTUDO SOBRE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE TOXIN
FECÇÕES DE ORIGEM ALIMENTAR EM ALGUNS PRO-
DUTOS DE LATICÍNIO COMERCIALIZADOS NO RIO
DE JANEIRO

Tese apresentada ao Decanato de Pes-
quisa e Pós-Graduação da Universi-
dade Federal Rural do Rio de Janei-
ro para obtenção do grau de Mestre
em Ciência e Tecnologia de Alimen-
tos.

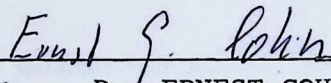
Aprovada em 05/06/81.

SONIA MARIA DA COSTA RAIMUNDO

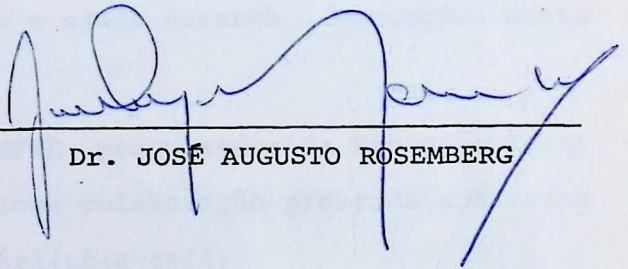
Junho de 1981

634.1277
R153 e

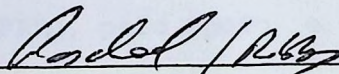
EXAMINADORES:



Dr. ERNEST COHN



Dr. JOSÉ AUGUSTO ROSEMBERG



Prof. PASCHOAL GUIMARÃES ROBBS

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que colaboraram para a realização deste trabalho e, mais especificamente:

ao Professor PASCHOAL GUIMARÃES ROBBS, do Departamento de Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Tecnologia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pela orientação segura, estímulo e ajuda durante a execução desta pesquisa;

ao Dr. ERNESTO HOFER, pesquisador da Fundação Instituto Oswaldo Cruz pela valiosa colaboração prestada nos trabalhos de sorotipagem de *Escherichia coli*;

aos colegas do Setor de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ, pelo apoio e ajuda que me prestaram;

ao Sr. CIDINOR VEIGA, técnico do Laboratório de Microbiologia da UFRRJ, pela ajuda na execução deste trabalho.

BIOGRAFIA

SONIA MARIA DA COSTA RAIMUNDO, filha de Ezequiel de Souza Breves e Maria de Lourdes da Costa Breves, nasceu no dia 20 de julho de 1948, no Estado do Rio de Janeiro. Frequentou o Grupo Escolar Ubaldina Dias Jacaré e o Colégio Fernando Costa. Prestou vestibular, em 1969, para o curso de Medicina Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, tendo colado grau em dezembro de 1972. Foi monitora da disciplina de Histologia e Embriologia.

Foi contratada pela UFRRJ, em abril de 1974, como Auxiliar de Ensino nas disciplinas de Tecnologia dos Produtos de Origem Animal I e II. Foi responsável pela leção da disciplina Tecnologia dos Produtos Agropecuários. Colaborou na leção de tópicos na disciplina de Microbiologia dos Alimentos e em cursos de especialização de Inspeção e Tecnologia de Alimentos; Ciências Domésticas - Nutrição e no Curso Emergencial do Convênio COAGRI/UFRRJ.

Iniciou o curso de Mestrado em Ciências e Tecnolo-

gia de Alimentos da UFRRJ, em agosto de 1976, tendo terminado os créditos em 1978.

Ao meu esposo

SANSÃO

pelo estímulo e apoio

As minhas filhas

ALINE, ROBERTA e FERNANDA

pela alegria que me transmitem.

Í N D I C E

1. INTRODUÇÃO -----	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	6
2.1. Aspectos Tecnológicos - Produtos Analisados ---	6
2.1.1. Leite Pasteurizado Tipo "C" -----	6
2.1.2. Leite em Pó -----	7
2.1.3. Creme de Leite -----	8
2.2. Microrganismos de interesse em Saúde Pública --	8
2.2.1. Indicadores de condições higiênico-sani- tárias - Grupo Coliforme -----	8
2.2.1.1. Importância em Saúde Pública --	9
2.2.1.2. Incidência em Alimentos -----	10
2.2.2. Microrganismos patogênicos -----	11
2.2.2.1. <i>Escherichia coli</i> enteropatogêni- ca -----	11
2.2.2.1.1. Características anti- gênicas -----	11
2.2.2.1.2. Patogenicidade -----	13

2.2.2.1.3. Surto da infecção ali mentar devido à <i>E.coli</i> enteropatogênica -----	14
2.2.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> -----	15
2.2.2.2.1. Características morfo- lógicas e bioquímicas-----	15
2.2.2.2.2. Patogenicidade -----	16
2.2.2.2.3. Surto de intoxicação alimentar causados por <i>S. aureus</i> -----	17
2.2.2.2.4. Incidência de <i>S.aureus</i> em alimentos veiculad <u>o</u> res -----	19
2.2.2.3. <i>Salmonella</i> -----	20
2.2.2.3.1. Características morfo- lógicas e bioquímicas-----	21
2.2.2.3.2. Patogenicidade -----	22
2.2.2.3.3. Surto de infecção ali mentar causados por <i>Sal</i> <i>monella</i> -----	23
2.2.2.3.4. Alimentos veiculadores	24
2.2.2.4. <i>Bacillus cereus</i> -----	25
2.2.2.4.1. Características morfo lógicas e bioquímicas	25
2.2.2.4.2. Patogenicidade -----	25
2.2.2.4.3. Surto de intoxicação de origem alimentar causados pelo <i>B.cereus</i>	27
2.2.2.4.4. Incidência de <i>B.cereus</i> em alimentos veiculad <u>o</u> res -----	28

3. MATERIAL E MÉTODOS -----	32
3.1. Material -----	32
3.1.1. Amostras -----	32
3.1.2. Meios de cultura e reagentes -----	32
3.2. Métodos -----	33
3.2.1. Microrganismos Pesquisados -----	33
3.2.2. Preparo das Amostras -----	33
3.2.2.1. Leite Pasteurizado -----	33
3.2.2.2. Leite em Pó e Creme de Leite- -----	33
3.2.3. Técnicas de Isolamento, Contagem e Iden- tificação dos microrganismos-----	34
3.2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> -----	34
3.2.3.1.1. Isolamento -----	34
3.2.3.1.2. Contagem -----	35
3.2.3.1.3. Caracterização de <i>S. aureus</i> patogêni- co -----	35
3.2.3.2. Coliformes Totais e Fecais --	36
3.2.3.2.1. Teste Presuntivo -	36
3.2.3.2.2. Teste Confirmativo	37
3.2.3.3. <i>Escherichia coli</i> Enteropatogê- nica -----	37
3.2.3.3.1. Isolamento -----	38
3.2.3.3.2. Caracterização Bio- química -----	40
3.2.3.3.3. Caracterização So- rológica -----	45

3.2.3.3.4. Provas Bioquímicas Complementares ---	47
3.2.3.4. <i>Salmonella</i> -----	49
3.2.3.4.1. Evidenciação -----	49
3.2.3.5. <i>Bacillus cereus</i> -----	50
3.2.3.5.1. Isolamento -----	50
3.2.3.5.2. Caracterização Bioquímica -----	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	54
4.1. Leite Pasteurizado Tipo "C" -----	54
4.2. Leite em Pó -----	62
4.3. Creme de Leite -----	67
4.4. Provas Bioquímicas Realizadas Para Caracterização de <i>E. coli</i> -----	71
4.5. Provas Bioquímicas Realizadas Para Caracterização do <i>B. cereus</i> -----	79
4.6. Provas Realizadas com as Culturas de <i>S. aureus</i> -----	81
5. CONCLUSÕES -----	84
6. RESUMO -----	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	88

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Contagens de coliformes totais e fecais, <i>E. coli</i> enteropatogênica, <i>S. aureus</i> coagulase (+), <i>Salmonella</i> e <i>B. cereus</i> em leite Pasteurizado tipo "C", coletado em Supermercados do Rio de Janeiro -----	55
Tabela 2.	Níveis de contaminação e distribuição percentual das contagens (em n°/ml) das 30 amostras de leite pasteurizado tipo "C" -----	56
Tabela 3.	Contagens de coliformes totais e fecais, <i>E. coli</i> enteropatogênica, <i>S. aureus</i> coagulase (+), <i>Salmonella</i> e <i>B. cereus</i> em leite em pó, coletado em Supermercados do Rio de Janeiro -----	63
Tabela 4.	Níveis de contaminação e distribuição percentual das contagens (em n°/ml) das 30 amostras de leite em pó -----	64
Tabela 5.	Contagens de coliformes totais e fecais, <i>E. coli</i> enteropatogênica, <i>S. aureus</i> coagulase (+), <i>Salmonella</i> e <i>B. cereus</i> em creme de leite, coletado em Supermercados do Rio de Janeiro -----	68
Tabela 6.	Níveis de contaminação e distribuição percentual das contagens (em n°/ml) das 30 amostras de creme de leite -----	69
Tabela 7.	Características bioquímicas observadas nas provas de triagem, realizadas em 366 culturas suspeitas de <i>E. coli</i> isoladas do Agar EMB e McConkey, a partir dos produtos analisados -----	73

Tabela 8.	Características bioquímicas complementares observadas em 184 culturas suspeitas de <i>E. coli</i> indol-positivas em 35 indol-negativas -----	74
Tabela 9.	Prova da Aglutinação com Tripaflavina e com os soros polivalentes A, B, C, realizadas em 205 culturas com características bioquímicas típicas de <i>E. coli</i> . Resultados expressos em número de cultura -----	76
Tabela 10.	Reação frente aos soros monovalentes "OK" e "O" de 46 culturas de <i>E. coli</i> positivas na sorologia polivalente -----	77
Tabela 11.	Caracterização bioquímica dos biotipos enteropatógenicos de <i>E. coli</i> isolados das amostras de leite pasteurizado e creme de leite -----	79
Tabela 12.	Resultado das provas bioquímicas realizadas com 222 culturas suspeitas de <i>B. cereus</i> isoladas a partir dos produtos analisados -----	81
Tabela 13.	Resultado das provas de coagulase e Desoxirribonuclease (DNase) Total e Termo-estável realizados com 110 culturas de <i>S. aureus</i> isoladas a partir de produtos analisados -----	83

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos podem constituir um importante veículo de transmissão de dois grupos principais de microrganismos pa togênicos para o homem.

O primeiro grupo compreende organismos produtores de zoonoses, ou seja, enfermidades infecciosas dos animais que são transmissíveis ao homem, tais como: brucelose, tuberculose, cólera, leptospirose, etc. Estes microrganismos ge ralmente têm um período de incubação muito grande, o que torna difícil descobrir qual o alimento que o transmitiu. Para mui tos deles, o alimento não é a principal fonte de infecção hu mana e, além disso, a maioria dos métodos de conservação de alimentos o destrói, com exceção das formas esporuladas de *Bacillus anthracis* (THATCHER & CLARK, 1973).

O segundo grupo compreende microrganismos produtores de toxinfecções de origem alimentar. Pode ser dividido em duas categorias: uma diz respeito a organismos que quando ingeridos juntamente com os alimentos, se multiplicam no hos

pedreiro. É o caso das salmoneloses, shigeloses, gastroenterites devido a certos biotipos de *Escherichia coli* e outros. Estas doenças são chamadas de infecções de origem alimentar. A outra compreende casos verdadeiros de envenenamento alimentar devido à ingestão de substâncias tóxicas biossintetizadas no alimento antes da ingestão. Estes casos são chamados de intoxicação de origem alimentar. Para que ocorram, há necessidade da presença de, pelo menos, 10^4 microrganismos/g no alimento (MOSSEL, 1975).

Contudo, segundo BLACK *et al.* (1978), os surtos sobre enfermidades transmitidas por alimentos são muito documentados e os relatos existentes sobre o assunto representam uma pequena fração (provavelmente menos de 1%) do total de incidência.

O leite e os produtos de laticínio podem ser, em particular, veículo de transmissão de doenças gastrintestinais e diarréicas (CAUDILL & MEYER, 1943; PERRIELLO, 1944; U.S.PUBLIC HEALTH LAB. SERV., 1950; BRYAN, 1974 e LEITÃO *et al.*, 1974) devido ao fato de serem muito manipulados desde o produtor até o consumidor.

BRYAN (1974), analisando os fatores que contribuíram para surtos de toxinfecções alimentares (725 surtos relatados entre os anos de 1961 a 1972), demonstrou que a refrigeração imprópria foi a de maior importância, sendo implicada em 336 casos. Pessoas infectadas e com pouca higiene pessoal contribuíram para 151 casos e a temperatura insuficiente durante o

processamento concorreu para 140 casos. A limpeza inadequada dos equipamentos provocou 52 casos. Como se pode notar, estes fatores poderão contribuir para contaminação excessiva dos produtos de laticínio, tornando-os problemáticos para a saúde pública.

Com a intenção de defender a saúde pública dessas toxinfecções, são criados padrões microbiológicos que estabelecem limites específicos para cada alimento.

No Brasil, no âmbito federal, existem dois padrões microbiológicos para alimentos. O primeiro padrão foi elaborado pelo Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), Órgão do Ministério da Agricultura e está contido no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (aprovado pelo Decreto nº 30.691 de 29/3/52 e alterado pelo Decreto nº 1.255 de 25/06 / 62). Regulamenta e fiscaliza todas as etapas de produção e beneficiamento do leite, desde a ordenha até sua saída das usinas de beneficiamento. Estabelece que:

art. 540 - Para a determinação do padrão bacteriológico do leite adotam-se as provas de contagem microbiana e teste da presença de coliformes;

art. 541 - O teor de coliformes para o leite tipo "C" é: tolerância em 0,2 ml;

art. 567 - Consideram-se impróprios para o consumo os cremes que:

"... § 2 - revelem a presença de germes patogênicos..."

art. 648 - O leite em pó destinado a consumo direto deve estar isento de impurezas, não conter germes patogênicos ou que causem deterioração do produto, nem revelar a presença de germes coliformes.

O segundo padrão foi elaborado pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), atualmente chamada de Câmara Técnica de Alimentos (CTA), do Ministério da Saúde, que há cerca de treze anos começou a se preocupar com relação a padrões de alimentos, inclusive com os microbiológicos. Para isto, foram criados Grupos de Trabalho (GT) para estabelecerem estes padrões em âmbito federal, o que resultou na Resolução nº 13/78 que especifica os seguintes limites para os produtos em questão:

Produto	Salmonella	Colif. Totais	Colif. Fecais	S. aureus
Leite Pasteurizado Tipo "C"	aus/25 ml	5/ml	aus/1 ml	-
Leite em Pó	aus/25 g	10/g	aus/1 g	10/g
Creme de Leite	aus/25 g	-	aus/1 g	-

Esta resolução estabelece limites máximos de tolerância dos principais microrganismos relacionados com a saúde pública, para todos os tipos de alimentos. O estabelecimento e fiscalização desses limites é difícil em um país onde o clima é variado e praticamente não havia preocupação com a qualidade microbiológica dos alimentos e, como consequência, poucos eram os dados sobre a realidade brasileira. Uma tônica firmada pelo GT de microbiologia (GT-14) foi a reavaliação periódica dos padrões frente aos resultados que se encontrariam a partir da Resolução nº 13/78. O Setor de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro vem realizando uma linha de trabalho no que se refere a levantamentos de condições microbiológicas de diferentes grupos de alimentos, principalmente no que tange a microrganismos de importância em saúde pública.

O presente trabalho visa, portanto, fornecer subsídios para uma melhor visão sobre a qualidade microbiológica, sob o aspecto saúde pública, de alguns produtos de laticínio (leite em pó, leite pasteurizado tipo "C" e creme de leite) a nível de consumidor, na área do Rio de Janeiro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ASPECTOS TECNOLÓGICOS DOS PRODUTOS ANALISADOS

2.1.1. Leite Pasteurizado Tipo "C"

O leite pasteurizado tipo "C" é caracterizado por diversos aspectos contidos no Artigo 510 do RIISPOA, entre os quais está a carga microbiana tolerada após a pasteurização (150.000 bactérias/ml).

O fluxograma de produção do leite pasteurizado tipo "C" segue as seguintes etapas: a) seleção do leite, baseada em análises físicas e químicas realizadas no momento da chegada do leite na usina de beneficiamento. Tais análises constam de: verificação da acidez pelo método Dornic, da percentagem de gordura pelo método Gerber, densidade, extrato seco total e de sengordurado e crioscopia; b) resfriamento a 5°C para evitar o aumento da carga microbiana; c) padronização da gordura; d) pré aquecimento para redução da carga microbiana; e) pasteurização,

para destruição da flora patogênica e redução da flora banal, em temperaturas que variam de 72 a 75°C por 15 a 20 segundos; f) resfriamento imediato a 2 ou 5°C para evitar que uma ação mais prolongada do calor afete a composição característica do leite; g) ensacamento e conservação do produto, sob refrigeração (5°C), para inibir o crescimento dos microrganismos resistentes à pasteurização (RIISPOA, 1962; VEISEYRE, 1972; SPREER, 1975 e S.I.P.A., 1980).

2.1.2. Leite em pó

Segundo o RIISPOA, o leite em pó é o produto resultante da desidratação total do leite, em condições adequadas, adicionado ou não de substâncias permitidas pelo DIPOA (Art. 642). As etapas de fabricação são iguais às descritas para o leite pasteurizado, desde a seleção até a pasteurização, seguindo-se após: a) concentração, através de aquecimento, para redução parcial da água até se obter, aproximadamente, 40 a 50% de sólidos totais, o que facilitará a operação de secagem; b) homogeneização, para melhor distribuição da gordura; c) desidratação ou secagem, onde se faz a retirada do restante da umidade do produto (permanece cerca de 3% de umidade no produto final). Esta operação pode ser realizada por atomização em "Spray-dryer" (atomização em spray) ou em secador de tambor. A temperatura, em ambos os casos, atinge aproximadamente 130 - 150°C; d) embalagem, sob tratamento com gás inerte.

te, aprovado pelo DIPOA (RIISPOA, 1962; VEISSEYRE, 1972 e SPREER, 1975).

2.1.3. Crème de leite

O creme de leite é preparado a partir da matéria gorda do leite (nata), a qual é separada através de centrifugação. O creme recolhido é selecionado de acordo com a acidez e recebe um tratamento no qual ocorrem redução da acidez e padronização da gordura, se for necessário, para 35%. A seguir, é pasteurizado em temperaturas que variam de 95 a 110°C por 10 a 15 minutos. Esta temperatura mais alta é necessária para a destruição dos microrganismos, uma vez que a gordura tem ação protetora sobre os mesmos, contra o calor. Logo após, o creme é resfriado a 15-20°C, podendo ou não ser fermentado durante 18-24 horas. A seguir é homogeneizado, refrigerado a 2-4°C e envasado, devendo ser conservado sob refrigeração até o consumo (SPREER, 1975).

2.2. MICRORGANISMOS DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA

2.2.1. Indicadores de condições higiênico-sanitárias: Grupo Coliforme

O grupo coliforme, segundo THATCHER e CLARK (1973), abrange os gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, os quais pertencem à família *Enterobacteriaceae*.

Aplica-se o termo "coliformes totais" a todos os gêneros citados e o termo "coliformes fecais" quando temos uma alta proporção de *E. coli*.

Estes microrganismos, têm como característica em comum serem bastonetes curtos, Gram-negativos, não esporulantes, móveis ou imóveis. São aeróbios ou anaeróbios facultativos, fermentadores de lactose com produção de gás. Morfologicamente não podem ser distinguidos de outros gêneros da mesma família (COWAN, 1974 e FISHBEIN *et al.*, 1976).

2.2.1.1. Importância em Saúde Pública

Os coliformes, pertencentes à família Enterobacteriaceae, de um modo geral, não são patogênicos, com exceção de alguns biotipos especiais de *E. coli*. A importância da pesquisa do grupo, em alimentos, reside no fato de ser utilizado para indicar uma contaminação fecal potencialmente perigosa, já que o "habitat" normal desta família é o trato intestinal do homem e outros mamíferos.

As espécies que compreendem o grupo coliforme podem multiplicar-se ou persistir em ambientes não fecais durante longos períodos. Estes microrganismos indicam mais exatamente contaminações posteriores aos tratamentos industriais, principalmente por ineficácia do sistema de limpeza e desinfecção da indústria, tratamento inadequado (insuficiente para inativá-los) ou que houve crescimento durante ou após o processamento.

Os coliformes fecais e, mais exatamente, a *E. coli*, indicam uma contaminação de origem fecal e consequentemente o risco de que também estejam presentes no alimento microrganismos entéricos patogênicos, tornando seu consumo perigoso à Saúde Pública (THATCHER e CLARK, 1973).

A *E. coli* possui alguns biotipos patogênicos denominados enteropatogênicos.

2.2.1.2. Incidência em alimentos

A incidência de coliformes em nove diferentes tipos de alimentos (490 amostras) nos Estados Unidos, foi estudada por HALL *et al.* (1967). Todos eles apresentaram-se contaminados por coliformes totais e fecais e, inclusive, por biotipos enteropatogênicos de *E. coli*. Entre os produtos mais contaminados por *E. coli* estavam a carne crua em primeiro lugar e em segundo, os queijos e derivados.

DECUM *et al.* (1974) estudaram a incidência de biotipos enteropatogênicos de *E. coli* com relação à higiene durante a ordenha, em três fazendas leiteiras. Foi investigado um total de 421 amostras do qual foram isoladas 193 cepas de *E. coli*, sendo 12 biotipos enteropatogênicos de *E. coli* isolados das amostras de leite e de superfícies que entram em contato com o leite (mãos do ordenhador, instalações, equipamentos, filtro e outros).

A ocorrência de *E. coli* enteropatogênica em 285 amostras

tras de leite e derivados (leite cru, pasteurizado, creme, manteiga, sorvete e queijo) na Índia, foi relatada por SINGH e RANGANATHAN (1974). Em 128 amostras de leite cru, 30 mostraram-se contaminadas por biotipos enteropatogênicos de *E. coli*. De 57 amostras de leite pasteurizado, nove continham cinco biotipos enteropatogênicos. Foram analisadas, ainda, 30 amostras de creme e manteiga, 35 de sorvete e 15 de queijo. *E. coli* enteropatogênica foi encontrada em três amostras de creme e manteiga, em oito de sorvete e em duas de queijo.

SACK *et al.* (1977) isolaram 240 cepas de *E. coli* de alimentos de origem animal (queijo, carne e pescado) nos Estados Unidos, das quais 8% eram enteropatogênicas. Os autores relataram que a produção de enterotoxina pelas cepas de *E. coli* isoladas, foi freqüente e que os alimentos são potencialmente importantes como veículo de transmissão de doenças diarréicas em seres humanos.

2.2.2. Microrganismos patogênicos

2.2.2.1. Escherichia coli enteropatogênica

2.2.2.1.1. Características antigênicas

A espécie *E. coli* possui alguns biotipos patogênicos para o homem. Estes biotipos são classificados através de métodos sorológicos que utilizam a propriedade de diferen

tes antígenos superficiais, tais como: Somáticos ("O"), Capsulares ("K") e Flagelares ("H") (KAUFFMANN, 1966). Existe cerca de 150 antígenos "O", 90 "K" e 50 "H" (ØRSKOV, 1974).

A primeira classificação de *E. coli* por métodos sorológicos foi realizada por KAUFFMANN em 1943, que subdividiu a espécie em grupos "O", criando, na época, 20 grupos. Atualmente, novos biotipos estão sendo descobertos e ØRSKOV *et al.* (1977) apresentaram um esquema com 164 grupos "O". Mutantes que perderam a especificidade "O" são as formas rugosas "R". A sorologia destas formas "R" tem pouco ou nenhum valor para a sorotipagem (ØRSKOV *et al.*, 1977). O termo antígeno "K" (capsular) foi introduzido por KAUFFMANN e VAHLNE em 1945, como um símbolo para representar quaisquer antígenos capsulares.

A descrição original do antígeno "K" foi baseada em uma reação de aglutinação bacteriana onde a não-aglutinação das bactérias (sem terem sofrido um prévio tratamento térmico) no soro anti-"O", foi considerada uma primeira característica da presença do antígeno "K". Os autores relatam que muitas substâncias e estruturas (flagelos, fímbrias) podem também interferir nesta não-aglutinação no soro anti-"O", porém, o fator mais importante nesta interferência é o antígeno "K". Estes antígenos são de natureza polissacarídica ou protéica. O antígeno "H" (flagelar), semelhante ao encontrado nas salmonelas é de natureza protéica. O grande número de antígenos "O", "K" e "H" e as possíveis combinações entre eles, indicam que

o número total de sorotipos de *E. coli* é bem alto (ØRSKOV, 1974).

2.2.2.1.2. Patogenicidade

Os biotipos enteropatogênicos de *E. coli* causam graves diarreias e gastroenterites em crianças com menos de 12 meses de idade, podendo, freqüentemente, serem fatais (THOMPSON, 1955; McNAUGHT e ROBERTS, 1958; KESSNER *et al.*, 1962; SAKAZAKI *et al.*, 1967; TRABULSI *et al.*, 1967; OGAWA *et al.*, 1968; SOUTH, 1971; GURWITH *et al.*, 1977 e ØRSKOV *et al.*, 1977).

O mecanismo pelo qual a *E. coli* enteropatogênica causa a diarreia é discutido. SOUTH (1971) diz que as cepas enteropatogênicas de *E. coli* colonizam o intestino delgado e provocam a passagem de água e eletrólitos, através do epitélio intacto intestinal, para o lúmen do intestino grosso, devido à produção de uma enterotoxina, sem invasão local ou sistemática do organismo. GURWITH *et al.* (1977) relatam que a *E. coli* enteropatogênica pode causar a diarreia devido à colonização do intestino delgado e produção de enterotoxina ou por invasão da mucosa do intestino grosso. Salientam, também, que a idade mais facilmente atingida por *E. coli* enteropatogênica é a de crianças lactentes (menores de 12 meses de idade), embora crianças maiores e adultos possam também ser atingidos.

Os sintomas da infecção por *E. coli* enteropatogênica se caracterizam por diarreia (com ou sem vômitos) não sanguinolenta e sem exsudato inflamatória nas fezes. Em crianças

pode ou não aparecer febre, que não é frequente em adultos. Estes sintomas duram geralmente de um a dois dias após o início do tratamento, podendo, às vezes, se prolongar por mais dias. O número de células necessário para iniciar a infecção está em torno de 10^6 a 10^{10} (SACK, 1975).

2.2.2.1.3. Surtos de infecção alimentar devido à *E. coli* enteropatogênica

Muitos casos de diarreia devido à *E. coli* enteropatogênica têm sido relatados.

McNAUGHT e ROBERTS (1958) estudaram 23 cepas de *E. coli* presentes em casos de gastroenterites infantis, na Inglaterra, sendo nove isoladas de bebês em casos graves, seis de bebês com casos menos graves, sete de bebês aparentemente saudáveis, sem sintomas e uma isolada de adulto com vômito e diarreia. Foram encontrados biotipos enteropatogênicos de *E. coli*.

KESSNER *et al.* (1962) estudaram um extensivo surto de diarreia devido à *E. coli* 0111:K58, ocorrido durante o inverno de 1960-1961, em Chicago, envolvendo 1.313 pessoas. Ocorreram 77 mortes, sendo os recém-nascidos os mais atingidos.

SAKAZAKI *et al.* (1967) estudaram, durante os anos de 1957 e 1966, casos de diarreia em adultos e crianças num

total de 1.076 pacientes hospitalizados em Tokio e 624 pessoas não hospitalizadas. Foram isoladas 789 cepas de *E. coli* enteropatógênica. Os casos de diarreia devido à *E. coli* enteropatógênica foram superiores, em número, aos devido à salmonela.

MARIER *et al.* (1973) documentaram um surto de diarreia associado com o consumo de queijo contaminado, onde foi isolada *E. coli* do grupo 0124.

FANTASIA *et al.* (1975) relataram um surto de infecção alimentar ocorrido em 1971, nos Estados Unidos, devido à ingestão de queijo, contaminando 200 pessoas. O microrganismo isolado com maior frequência foi a *E. coli* O 124:K72.

2.2.2.2. *Staphylococcus aureus*

2.2.2.2.1. Características morfológicas e bioquímicas

A espécie *S. aureus*, descrita originalmente por ROSENBACH, em 1884, pertence à família *Micrococcaceae*. É um cooco imóvel, não esporulante, Gram-positivo. Possui metabolismo respiratório e fermentativo. É catalase-positivo. Produz ácido a partir da glucose, lactose, maltose e manitol. Produz vários enzimas, como proteases, lipases, fosfolipases e lipoproteína lipases. A maior parte das cepas pode hidrolisar proteínas de origem animal como a hemoglobina, a fibrina, a albumina e a caseína. São conhecidas, pelo menos três hemolisinas

produzidas pelos estafilococos (alfa, beta e delta). Produzem também fosfatases ácida e alcalina e nuclease termoresistente. A maior parte das cepas produz coagulase e várias toxinas (MINOR e MARTH, 1971; BAIRD-PARKER, 1974).

2.2.2.2.2. Patogenicidade

S. aureus foi isolado originalmente de pus de feridas, podendo também ser encontrado nas fossas nasais, boca e pele do homem e de outros animais. É potencialmente patogênico para o homem. Algumas cepas coagulase positivas podem causar intoxicações de origem alimentar, além de infecções (abscessos, meningites, furunculoses etc.) (BAIRD-PARKER, 1974). A presença de *S. aureus* em alimentos indica contaminação que pode ser originada a partir da matéria prima, dos operários que lidam com o alimento ou dos equipamentos mal higienizados. Em temperatura de armazenamento inadequada, o seu número pode aumentar dependendo do tipo de alimento (THATCHER e CLARK, 1973).

O consumo de alimentos contendo grande número de estafilococos produz sintomas de intoxicação alimentar caracterizados por náuseas, vômitos, diarreia, mal-estar geral, debilidade física e dores abdominais. O período de incubação, desde a ingestão do alimento contaminado até o aparecimento dos sintomas, pode variar de uma a seis horas (em média três horas), dependendo da quantidade de toxina ingerida e da sensibilidade da pessoa. Estes sintomas são provocados por poli-

péptidos específicos que atuam como toxinas eméticas e que são liberadas pelo *S. aureus* no alimento, através de um mecanismo ainda pouco conhecido (CAUDILL e MEYER, 1943; PERRIELLO, 1944; DRYSDALE, 1950; HOBBS, 1955; ANDERSON e STONE, 1955; Mc COY, 1959; MUNCH-PETERSEN, 1960, WIENEKE, 1974).

Existem cinco diferentes tipos de enterotoxinas estafilocócicas bem conhecidas: A, B, C, D e E. Segundo JAY (1973) a maior parte das cepas produtoras de intoxicação produz a enterotoxina A que é a mais resistente ao calor e a maior responsável pelo aparecimento dos sintomas de intoxicação.

WIENEKE (1974) relata que as enterotoxinas A, B, C e E são produzidas mais freqüentemente pelas cepas isoladas de alimentos cozidos (carnes, pescados e aves) e de seres humanos do que de alimentos crus (carne, leite e queijos tipo Cheddar).

O número de estafilococos necessário para provocar a intoxicação é bem alto, em torno de 10^6 a 10^9 células/g de alimento (HOBBS, 1962; PETERSON *et al.*, 1962; DONNELLY *et al.*, 1966).

2.2.2.2.3. Surtos de intoxicação alimentar causados por *S. aureus*

A importância do *S. aureus* no alimento está na capacidade que algumas cepas tem de produzir enterotoxinas, se a temperatura de processamento ou armazenamento deste alimento for apropriada para isto. A pasteurização ou outros tratamentos térmicos

podem destruir o microrganismo porém a enterotoxina, que é termo-resistente, continuará ativa.

Surtos de intoxicação estafilocócica provocados pela ingestão de leite cru ou pasteurizado são citados por HACKLER (1939), CAUDILL e MEYER (1943), PERRIELLO (1944), COCKBURN (1950), DRYSDALE (1950), DACK (1962), MINOR e MARTH (1972).

MUNCH - PETERSEN (1960) cita 440 surtos com 20.000 casos, ocorridos nos E.U.A., nos quais o leite e derivados foram os alimentos implicados. Quanto às possíveis causas de contaminação do leite, Mc COY (1959) e MINOR e MARTH (1972) apontam a mastite estafilocócica, enquanto MUNCH - PETERSEN (1960) acha que o homem é frequentemente a fonte de contaminação do leite e derivados e até do úbere bovino.

Surtos de intoxicação estafilocócica provocados pelo consumo de leite em pó são citados por ANDERSON e STONE (1955), HOBBS (1955), MINOR e MARTH (1972). ANDERSON e STONE (1955) relatam que uma possível fonte de contaminação do leite em pó é o tanque de balanceamento, por onde o leite passa após ter sido pasteurizado e concentrado, antes de ser desidratado. Segundo os autores a passagem por este tanque é demorada, facilitando a acumulação de limo nas paredes, no qual ocorre multiplicação de microrganismos, provocando recontaminação do leite pasteurizado.

2.2.2.2.4. Incidência de *S. aureus* em alimentos. Alimentos veiculadores

Diversos produtos de laticínios têm sido relatados como veículo de transmissão de estafilococos em vários surtos, entre eles são citados: o leite (HACKLER, 1939; CAUDILL e MEYER, 1943; PERRIELLO, 1944; DRYSDALE, 1950; COCKBURN, 1950; MINOR e MARTH, 1972); o creme de leite (COUGHLIN e JOHNSON, 1941; COCKBURN, 1951; WALLACE, 1957; citados por MUNCH-PETERSEN, 1960) e o leite em pó (ANDERSON e STONE, 1955; HOBBS, 1955; ARMIJO *et al.*, 1957).

TATINI *et al.* (1971) estudaram os fatores que influenciam a produção de enterotoxina A estafilocócica no leite. Relataram que o número mínimo de estafilococos necessário para produzir a enterotoxina A no leite cru depende da presença de microrganismos competidores. Num leite relativamente livre de flora competitiva, uma população de 2 a 3 milhões de estafilococos/ml foi suficiente para produzir a enterotoxina A. Devido a esta facilidade de produção de enterotoxina, os autores enfatizaram o perigo de contaminação do leite pós-tratamento térmico e subsequente exposição à temperaturas adequadas ao crescimento do *S. aureus*.

DABBAH *et al.* (1971), estudando a curva de sobrevivência térmica de bactérias no leite, encontraram que um pequeno número de *S. aureus* foi capaz de resistir a um aquecimento de 62,5°C durante 30 a 120 minutos. Isto indica que se a contaminação inicial é alta e

as condições são favoráveis para a recuperação e crescimento do *S. aureus*, é possível o perigo de intoxicação alimentar com leite pasteurizado.

Com respeito a alimentos veiculadores de estafilococos, MUNCH-PETERSEN (1963) cita a carne, o leite e os produtos derivados como os principais.

THATCHER e CLARK (1973) relatam que alimentos preparados com leite não pasteurizado (alguns tipos de queijo) e outros como maioneses, cremes, recheios, queijo ralado, quando contaminados, são importantes veículos de difusão porque entram no preparo de outros alimentos onde os estafilococos podem multiplicar-se rapidamente e produzir enterotoxina.

2.2.2.3. Salmonella

2.2.2.3.1. Características morfológicas e bioquímicas

O gênero *Salmonella*, descrito por LIGNIERES em 1900, pertence à família *Enterobacteriaceae*. São bastonetes pequenos, geralmente móveis, não esporulantes, Gram-negativas. Produzem ácido a partir da glucose, arabinose, maltose, manitol, sorbitol, trealose e xilose. Não utilizam a salicina, o adonitol e a sacarose. Algumas cepas fermentam a lactose. A maior parte das cepas produz gás, com exceção de *S. typhi*. Produzem H_2S a partir do meio T.S.I. (Triple Sugar Iron). São lisina-decarboxilase positivas (Le MINOR e ROHDE, 1974).

As salmonelas foram classificadas de acordo com o esquema de Kauffmann White, baseado nos antígenos somáticos ("O") e flagelares ("H"). As espécies e variedades de salmonelas são reunidas em grupos (A, B, C, etc.) de acordo com suas analogias na apresentação de um ou mais antígenos. Os sub-grupos são denominados serotipos e agrupados de acordo com o antígeno "O" enquanto o antígeno "H" representa o tipo (MARTH, 1969).

Os antígenos da Virulência ("Vi") referem-se a antígenos somáticos localizados na periferia da célula microbiana e que impedem o acesso das aglutinas "anti-O" (anticorpos) a seus antígenos homólogos. São termo-lábeis (Le MINOR e RHO DE, 1974). Até 1973, conhecia-se 1.200 serotipos de *Salmonella* e a cada ano este número tende a aumentar (JAY, 1973).

2.2.2.3.2. Patogenicidade

As salmonelas têm sido um grande problema para o homem, os animais domésticos e seus alimentos. O "habitat" normal desses microrganismos é o trato intestinal do homem e outros animais. A partir daí, são eliminadas com as fezes para o meio ambiente, onde podem contaminar direta ou indiretamente o solo, a água e serem transmitidas aos alimentos por insetos, por roedores, pela água, pelo homem ou pelos próprios animais fornecedores dos alimentos. Quase todas as espécies de *Salmonella* são patogênicas para o homem e outros animais causando infecções de origem alimentar.

Para que ocorra a infecção é necessário ingerir, dependendo do sorotipo, uma quantidade que varia de 10^6 a 10^9 células viáveis de alimento. Não há, até o momento, evidências que se produzam substâncias tóxicas extracelulares responsáveis pela enfermidade. Presume-se que os sintomas estejam ligados a uma endotoxina que seria liberada pelas células por ação do pH e das proteases estomacais. Os sintomas da enfermidade podem ser agrupados em três quadros clínicos: a) Febre Tifóide: causada por *S. typhi*. É a mais grave enfermidade provocada por este gênero. Os sintomas se caracterizam por temperatura elevada, microrganismos circulantes no sangue e, às vezes, na urina, mortalidade elevada em crianças e pessoas idosas; b) Febre Paratifóide ou Paratifo: causada pela *S. paratyphi*. Os sintomas são mais benignos e a febre é mais baixa. Os microrganismos podem ser isolados no sangue; c) Gastronterite: causada pelas outras espécies de salmonela. Caracteriza-se por febre moderada, náuseas, vômitos, diarreia, dores abdominais e prostração. O período de incubação varia de 6 a 18 horas. Os hemocultivos são negativos. Os sintomas podem persistir por dois ou três dias. A severidade e a duração da doença varia com a quantidade de células ingeridas, a espécie do microrganismo e a resistência do indivíduo. Algumas vezes os sintomas podem durar semanas ou até meses. Alguns pacientes (0,2 a 5%) tornam-se portadores das salmonelas. O índice de mortalidade varia, segundo alguns autores, de 1 a 4,1% (PROST e RIEMANN, 1967; MARTH, 1969; JAY, 1973; MOSSEL,

1975).

2.2.2.3.3. Surtos de infecção alimentar causados por *Salmonella*

Os surtos de salmoneloses têm sido relatados com relativa frequência.

COCKBURN (1950) relacionou um total de 1.369 casos ocorridos na Inglaterra em 1949, devido ao consumo de vários tipos de alimentos (peixes, carnes, ovos, leite e derivados, alguns vegetais) contaminados.

MARTH (1969) fez uma revisão detalhada sobre salmonelas e o problema que elas representam numa indústria de laticínios. Relatou vários surtos de salmonelose ocorridos nos anos de 1957 a 1966, nos Estados Unidos, observando que: a) o número de surtos aumentou de 6.693 casos em 1957 para 16.841 em 1966; b) os surtos foram quase constantes desde 1964 (aproximadamente 17.000/ano).

Numerosos casos de salmonelose envolvendo o consumo de leite e derivados (leite cru, pasteurizado, leite em pó, leite fermentado, sorvete, manteiga, queijo e creme) têm sido descritos (KNOX *et al.*, 1963; HUTCHINSON, 1964; TAYLOR *et al.*, 1974; BRYAN, 1974; U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE, 1974 e 1976, Mc COY, 1975; SNYDER *et al.*, 1978).

2.2.2.3.4. Alimentos veiculadores

POTTER (1967) cita, como maiores veiculadores de salmonela, os alimentos aves, ovos e carne. O leite e derivados são apontados em menor escala. Segundo o autor, nenhum alimento é completamente imune à contaminação por salmonelas, com exceção daqueles que são esterilizados dentro da própria embalagem ou embalados assepticamente após esterilização.

JAY (1973) cita como principais veiculadores, as aves, carnes e produtos cárneos, ovos, leite em pó, água e outros (corantes, produtos de glândulas animais, ração animal). Faz a observação que os ovos e o leite em pó são muito importantes como veículo de transmissão de salmonela porque entram na composição de muitos outros alimentos processados.

Segundo MOSSEL (1975) todo alimento cru de origem animal e alguns vegetais podem ser contaminados por salmonela. Isto se deve ao fato de que grande número de animais, aparentemente sadios, usados na produção de alimentos (suínos, bovinos, aves) são portadores de salmonela.

LEITÃO (1979) examinou 40 amostras de leite em pó integral e desnatado, as quais se mostraram negativas quanto à presença de salmonelas.

2.2.2.4. Bacillus cereus

2.2.2.4.1. Características morfológicas e bioquímicas

Bacillus cereus, descrito originalmente por FRANKLAND e FRANKLAND em 1887, pertence à família *Bacillaceae*. É um bastonete longo, Gram-positivo, de motilidade variada, aeróbico facultativo, esporulante. Utiliza a glicose produzindo ácido e gás, a frutose e a trealose. Não ataca a xilose, arabinose, galactose, sorbose, sorbitol, manitol e dulcitol. Algumas cepas atacam a sacarose, salicina, maltose, manose, glicerol e lactose. Hidrolisa a caseína e produz lise na gema do ovo. Produz substâncias extracelulares tais como hemolisina, toxina solúvel letal para ratos, enzimas proteolíticas e fosfolipase C (GOEPPERT *et al.*, 1972; GIBSON e GORDON, 1974).

2.2.2.4.2. Patogenicidade

O isolamento de grande número de *B. cereus* de alimentos implicados em surtos de enfermidades gastrintestinais é uma evidência presuntiva de que este microrganismo pode ser o agente responsável. Sua enteropatogenicidade tem sido comprovada através de sintomas provocados em voluntários humanos alimentados com cultura pura deste microrganismo (HAUGE, 1955).

Experimentos feitos com animais (ratos, cobaias, cães) baseados em alimentação com cultura de células e

injeção intraperitonal de bacilos cultural e bioquimicamente idênticos ao *B. cereus*, também conseguiram provocar os sintomas da intoxicação (SEITZ, 1913; MEYER, 1951; NYGREN, 1962).

Uma importante consideração a ser feita sobre a enteropatogenicidade do *B. cereus* é: qual o agente tóxico ativo? Seria uma intoxicação ou uma infecção?

HAUGE (1955) demonstrou que a cultura integral de *B. cereus* produziu os sintomas de intoxicação em voluntários humanos, mas, filtrados Seitz da mesma cultura não os produziu.

NYGREN (1962) afirma que a hidrólise da lecitina pela fosfolipase C do *B. cereus* produz a fosforilcolina e que esta seria o agente tóxico responsável pela enfermidade.

GOEPFERT *et al.* (1972), fazendo uma revisão sobre *B. cereus*, compararam os trabalhos de HAUGE (1955) e NYGREN (1962). Concluíram que provavelmente o princípio tóxico não seria a fosforilcolina, uma vez que ela passaria pelo filtro Seitz. Os autores relataram que os dados obtidos até aquele momento não permitiam uma conclusão definitiva sobre a natureza do fator enteropatogênico. A idéia de uma enterotoxina as sociada à célula bacteriana e liberada pela lise desta célula, está de acordo com outros conhecimentos característicos sobre a enfermidade, tais como: a) necessidade de grande número de células para o aparecimento dos sintomas; b) rápido aparecimento e curta duração dos sintomas; c) ausência de febre

e dificuldade de isolamento do bacilo nas fezes, indicando que não ocorre invasão do tecido nem multiplicação dentro do intestino em grande extensão.

SPIRA e GOEPFERT (1972) usaram o método da alça intestinal ligada de coelho como um modo experimental para investigar a enfermidade. Os autores relataram que há evidência presuntiva de que a enfermidade seja uma intoxicação e não uma infecção.

MOSSEL (1975) relata que a enterite, devida ao *B. cereus* resulta da formação nos alimentos, de um metabolito que irrita a mucosa intestinal quando ingerido e que o número de células necessárias para provocar os sintomas está em torno de $10^6/g$.

2.2.2.4.3. Surto de intoxicação de origem alimentar causados pelo *B. cereus*

A literatura européia cita vários casos de toxinfecção de origem alimentar causados por *B. cereus* ou um esporulante semelhante. GOEPFERT *et al.* (1972) citam que de 367 casos de intoxicação investigados pela Stockholm Board Health, entre 1936 a 1943, 117 foram suspeitos de terem sido causados por esporulantes aeróbicos.

CHRISTIANSEN *et al.* (1951) relatam um surto de intoxicação alimentar que provocou diarreia em 15 entre 18 adultos

e 106 entre 150 crianças que consumiram um pudim contaminado com *B. cereus* (cerca de $1,3 \times 10^7$ células/g) na Dinamarca.

HAUGE (1955) cita quatro grandes surtos de intoxicação alimentar ocorridos na Noruega entre 1947 e 1949, envolvendo 600 pessoas. O microrganismo isolado foi o *B. cereus*.

Outros investigadores têm relatado surtos de intoxicação alimentar causados pelo *B. cereus* (ORMAY e NOVOTNY, 1968 e 1970; BIRZU *et al.*, 1968 e MIDURA *et al.*, 1970, VLAD, 1972).

Segundo KIM e GOEPFERT (1971) não tem havido muitos relatos atuais sobre surtos de intoxicação alimentar causados pelo *B. cereus* nos E.U.A. Os autores acham que talvez seja devido à falta de atenção na análise de alimentos suspeitos.

2.2.2.4.4. Incidência de *B. cereus* em alimentos. Alimentos veiculadores

Segundo GOEPFERT *et al.* (1972) existem relativamente poucas detecções de alimentos contaminados por *B. cereus*.

Em 1957, KJELLANDER e NYGREN (citados por NYGREN, 1962) examinaram 514 amostras de alimentos e encontraram que 26% das amostras de carnes, 77% de leite e 51% das de frutas e vegetais estavam contaminadas por *B. cereus*.

Em 1959, ANDERSON e STORGARDS (citados por NYGREN, 1962) reportaram que 129 de 486 amostras de leite pasteurizado, 147 de 161 amostras de creme e 157 de 161 amostras de creme batido continham *B. cereus* viáveis.

NYGREN (1962) mostrou que 51,6% de 1.546 amostras de ingredientes para alimentos, 43,8% de 1.911 amostras de cremes e pudins e 52,2% de 431 amostras de carne e produtos vegetais continham *B. cereus* num nível de contaminação em torno de 1×10^2 células/g.

Na Romênia, IONESCU *et al.* (1966) observaram uma frequência relativamente alta de *B. cereus* em produtos de laticínio, 86,7% das amostras de leite pasteurizado examinadas continham *B. cereus* em níveis que variavam de 1×10^{-1} a 1×10^1 células/ml.

SHEHATA e COLLINS (1970) conseguiram isolar *B. cereus* a partir de amostras de leite cru, submetidas a tratamento térmico de 80°C por 10 minutos, resfriadas e incubadas a 4 a 7°C por três ou quatro semanas.

Segundo BILLING e CUTHBERT (1958) e DONOVAN (1959) a maior fonte de contaminação do leite é o latão. O último autor relata que o latão mal lavado e guardado por uma noite antes do uso estimula a esporulação das formas vegetativas de *B. cereus*, porque a lavagem dilui os nutrientes do leite.

Além de estar associado a surtos de intoxicação,

quando em grande número, o *B. cereus* tem sido relacionado com deterioração de alimentos, principalmente do leite e derivados. STONE e ROWLANDS (1952) e STONE (1952) mostraram que o *B. cereus* é um dos responsáveis por uma alteração que pode ocorrer no leite cru ou pasteurizado, conhecida nos E.U.A. e na Inglaterra pela expressão "Broken" ou "Bitty cream". Os estudos desses autores mostraram que a lecitinase do *B. cereus* ataca a lecitina da membrana do glóbulo de gordura, dissolvendo-a, o que resulta numa dispersão irreversível do creme em partículas de vários tamanhos quando agitado.

JAYNE-WILLIAMS e FRANKLIN (1960), estudando a presença de bacilos esporulantes no leite, descrevem esta mesma alteração, caracterizando-a pelo aparecimento de flocos, na nata do leite, que não se desmancham quando o leite é misturado ao chá, café, etc. Relatam que estes flocos geralmente precedem às trocas de "flavor" e à perda da estabilidade térmica do leite.

CHOUDHERY e MIKOLAJCIK (1971) relataram uma alteração no leite e derivados, chamada "coalhada doce". Este defeito foi associado à organismos pertencentes ao gênero *Bacillus*, particularmente, ao *B. cereus* e é devido a um exoenzima produzido pelas células, em fase de crescimento exponencial. Segundo os autores, essa exoenzima produz efeitos semelhantes ao da renina no leite, ou seja, formação de para-k-caseína.

Segundo GOEPFERT *et al.* (1972), o tratamento térmico dado aos alimentos pode não ser suficiente para matar os esporos e o resfriamento inadequado após o cozimento estimula os esporos a germinarem, resultando numa multiplicação de células vegetativas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Amostras

Foram examinadas amostras de leite em pó integral, leite pasteurizado tipo "C" e creme de leite, coletadas em supermercados do Rio de Janeiro, por um período de 12 meses (24/7/78 a 30/7/79), nas condições em que estes produtos são comercializados, com exceção de algumas amostras de creme de leite que foram obtidas de embalagens comerciais, provenientes do consumo interno de um hotel. De cada tipo de alimento foram examinadas três marcas comerciais diferentes, sendo analisadas dez amostras de cada marca. Com exceção do leite em pó, todas as amostras foram levadas ao laboratório sob refrigeração e analisadas no mesmo dia.

3.1.2. Meios de cultura e reagentes

Os meios de cultura utilizados foram obtidos das

firmas: Merck e 'Difco Laboratories'. Os reagentes químicos utilizados foram "pro-analysis", obtidos das firmas: Carlo Erba, Merck e Reagen.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Microrganismos Pesquisados

Foram pesquisados os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* coagulase (+), coliformes totais e fecais, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Salmonella* spp. e *Bacillus cereus*.

3.2.2. Preparo das Amostras

3.2.2.1. Leite Pasteurizado

Após abertura asséptica do pacote, foi feita a diluição 10^{-1} de acordo com a metodologia recomendada por THATCHER e CLARK (1973), diluindo-se 25 ml da amostra em 225 ml de tampão fosfato, pH 7,2.

3.2.2.2. Leite em Pó e Creme de Leite

Foram feitas diluições 10^{-1} e 10^{-2} , seguindo a metodologia acima citada.

3.2.3. Isolamento, Contagem e Identificação dos microrganismos

3.2.3.1. *Staphylococcus aureus*

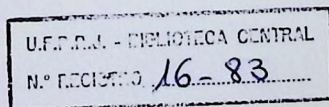
Foi seguido o método recomendado por THATCHER e CLARK (1973) com algumas modificações.

3.2.3.1.1. Isolamento

Com o leite pasteurizado e o creme de leite, sem diluição, foram feitos plaqueamentos diretos em Agar Baird- Parker, de alíquotas de 0,3 ml (em quadruplicata) e de 0,4 ml (em duplicata), perfazendo um total de 2 ml, e de alíquotas de 0,1 ml (em triplicata) a partir da diluição 10^{-1} .

Com o leite em pó, o plaqueamento em Agar Baird - Parker foi realizado a partir de alíquotas idênticas de 0,3 e 0,4 ml retiradas da diluição 10^{-1} e alíquotas de 0,1 ml da diluição 10^{-2} .

As placas foram incubadas a 37°C por 24 - 48 horas. Paralelamente, foram feitos enriquecimentos para as amostras de leite pasteurizado e leite em pó, utilizando-se 1 ml ou g de cada amostra como inóculo para os seguintes meios: Caldo sal 6,5%, Caldo sal 10%, Caldo glucosado e Caldo para enriquecimento de estafilococos. O uso deste último meio foi recomendado por MOSSEL e QUEVEDO (1967). Após incubação a 37°C por 24 horas, retirou-se de cada enriquecimento, uma al



7792

çada que foi semeada por esgotamento em Agar Baird-Parker, o qual foi incubado a 37°C por 24 a 48 horas.

3.2.3.1.2. Contagem

As colônias típicas (negras, envoltas por um halo de lise e às vezes com zona de precipitação) foram contadas e, em número significativo (cinco, quando haviam até dez colônias e a raiz quadrada, quando eram mais que dez), repicadas para tubos de Caldo Infusão de Cérebro e Coração (Brain Heart Infusion, BHI), que foram incubadas a 37°C por 20 a 24 horas.

3.2.3.1.3. Caracterização de *S. aureus* patogênico

As culturas foram testadas quanto à produção de coagulase, segundo método descrito por THATCHER e CLARK (1973). Para esta prova foi retirado 0,1 ml do crescimento em BHI e adicionado a 0,3 ml de plasma de coelho (DIFCO), em tubos de hemólise, incubados a 37°C por 4 a 24 horas. Foram considerados positivos, para a produção de coagulase, os tubos que mostraram visível coagulação do plasma.

Paralelamente foi realizada a pesquisa de Desoxirribonuclease (DNase), segundo método descrito por LACHICA *et al.* (1971), colocando-se uma gota da cultura de 24 horas em BHI sobre uma lâmina previamente recoberta por Agar Azul de Toluidina-DNA, e incubando-se a 37°C por 1 a 4 horas.

A formação de um halo de cor rosa-violeta, em torno da gota evidenciou a produção de DNase. Para a pesquisa da DNase termoresistente foi aplicada a mesma técnica, apenas usando - se as culturas em BHI previamente fervidas por 15 minutos.

3.2.3.2, Coliformes Totais e Fecais

Coliformes totais e fecais foram pesquisados pelo método do Número Mais Provável (NMP), de acordo com THATCHER e CLARK (1973), compreendendo as seguintes etapas:

3.2.3.2.1, Teste Presuntivo

a) Com leite pasteurizado: a partir da amostra original (sem diluição), foram retiradas alíquotas em triplicata de 10, 1 e 0,1 ml, as quais foram inoculadas em Caldo Lauril-Sulfato-Triptose (CLST) concentração dupla (para a alíquota de 10 ml) e simples (para as demais alíquotas).

b) Com leite em pó: foi utilizado o mesmo procedimento com a única diferença que as alíquotas foram retiradas da diluição 10^{-1} .

c) Com creme de leite: da amostra original (sem diluição) retirou-se alíquotas de 10 a 1 ml, da diluição 10^{-1} alíquotas de 1 ml e da diluição 10^{-2} alíquotas de 1 e 0,1 ml. Todas as alíquotas, em triplicata foram semeadas em CLST de concentração dupla e simples como descrito anteriormente.

Os tubos de CLST foram incubados a $35^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 - 48 horas. A presença de gás nos tubos de Durham foi considerada resultado positivo.

3.2.3.2.2. Teste Confirmativo

Os tubos positivos do teste presuntivo foram repicados com uma alçada para tubos contendo Caldo Verde-Brilhante-Lactose-Bile 2% (CVBLB) para evidenciar os coliformes totais e para o Caldo *E. coli* (ECM) para evidenciar os coliformes fecais. Os tubos de CVBLB foram incubados a $35^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ e os tubos de ECM a $45,5^{\circ} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, ambos por um período de 24 a 48 horas.

Os tubos com produção de gás foram considerados positivos e os NMP de coliformes totais e fecais foram lidos na tabela para série de três tubos, sendo posteriormente transformados em NMP por g ou ml.

3.2.3.3. *Escherichia coli* Enteropatogênica

Para pesquisa e caracterização bioquímica da *E. coli* enteropatogênica seguiu-se a recomendação de MEHLMAN *et al.*

(1974). As culturas selecionadas após as provas bioquímicas foram testadas sorologicamente segundo método decrito por EDWARDS e EWING (1972).

3.2.3.3.1. Isolamento

A pesquisa de *E. coli* enteropatogênica teve início a partir de dois enriquecimentos seletivos: um para microorganismos rápido fermentadores de lactose e outro para lento-fermentadores.

Para a pesquisa dos rápido-fermentadores de lactose, diluiu-se 25 g ou ml da amostra em 225 ml de Caldo Nutritivo (CN). Desta diluição, foi feito um plaqueamento em Agar Eosina-Azul de Metileno (EMB) e Agar McConkey. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e a diluição com o Caldo Nutritivo foi repicado, através de uma alçada para 30 ml do Caldo de Enriquecimento Entérico (CEE) o qual foi incubado a $41,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. O crescimento neste meio foi testado sorologicamente com os antissoros polivalentes dos grupos A, B e C (DIFCO). Para isto retirou-se 10 ml do crescimento no Caldo EE e neutralizou-se com solução a 10% de NaHCO_3 , até atingir pH 7. Numa placa de vidro desenhou-se quatro retângulos e, em cada um, colocou-se uma gota da cultura neutralizada e mais uma

gota de salina fisiológica estéril no primeiro retângulo (controle). Nos retângulos 2, 3 e 4 colocou-se, respectivamente, uma gota de antissoro Poli A, Poli B e Poli C. As duas gotas de cada retângulo foram misturadas com movimentos rotatórios da placa e com a ajuda de uma alça de platina. A mistura foi observada na lupa, onde procurou-se ver a formação de grumos, resultantes da aglutinação entre antígeno e anticorpo. A recomendação de MEHLMAN *et al.* (1974) era para que se descartasse os resultados negativos, porém, para maior segurança, não os desprezamos e continuamos com a realização normal da técnica. A partir do Caldo EE foi feito plaqueamento por meio de estrias em Agar EMB e Agar McConkey, os quais foram incubados a 35°C por ± 2 horas.

Para a pesquisa dos lento-fermentadores de lactose 25 g ou ml da amostra foram diluídas em 225 ml de Caldo McConkey e incubadas a 35°C por 20 ± 2 horas. Após este período foi feita uma repicagem com alça de platina para 30 ml do Caldo Lauril-Triptose (CCT) que foi incubado a $44 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ por 20 ± 2 horas. A cultura crescida neste meio foi igualmente testada frente aos antissoros polivalentes A, B e C (DIFCO), de maneira idêntica à citada para os rápidos-fermentadores de lactose e semeada, por meio de estrias em placas de Agar EMB e incubada a 35°C por 24 horas. O Agar EMB foi usado para isolar

os rápidos fermentadores de lactose. As colônias típicas apresentaram-se com brilho metálico esverdeado, com núcleo escuro. O Agar McConkey foi usado para evidenciar os lento-fermentadores de lactose. As colônias típicas eram incolores ou rosa-claro, às vezes com zona clara ao redor.

De cada placa de Agar EMB e Agar McConkey foram isoladas (quando possível) cinco colônias típicas de *E. coli*, perfazendo um total de 25 colônias por amostra, as quais foram estocadas em Agar Nutritivo, recoberto com óleo mineral estéril ("Nujol") para posterior caracterização bioquímica.

3.2.3.3.2. Caracterização Bioquímica

As culturas suspeitas de *E. coli* foram repicadas para Agar Nutritivo inclinado e incubadas por 24 horas. A partir daí, foram feitas sementeiras nos meios específicos para as provas bioquímicas recomendadas por MEHLMAN *et al.* (1974). Para a realização destas provas, seguiu-se as técnicas descritas por COSTA e HOFER, 1972; THATCHER e CLARK, 1973; MEHLMAN *et al.*, 1974..

Inicialmente foram feitas cinco provas de triagem, descritas a seguir:

Reação no Agar Tríplice Açúcar-Ferro (TSI)

A inoculação no meio foi feita por picada central se

guida de estriamento na superfície. A incubação foi realizada a 37°C por 24 horas. Neste meio foram observados fermentação dos açúcares, produção de H₂S e gás.

Fermentação de Arabinose

O meio básico para fermentação de carboidratos (COSTA e HOFER, 1972) adicionado de arabinose, foi inoculado e incubado a 35°C por 24 horas. Foi observada a produção de ácido.

Produção de Urease (meio de Christensen)

A superfície do meio foi semeada com inóculo abundante e a incubação foi feita a 37°C por 24 horas. Os tubos negativos foram, ainda, observados por sete dias. As culturas ureases positivas alcalinizaram o meio.

Produção de Indol

O meio (água peptonada) foi semeado e incubado a 37°C por 48 horas. Após este período adicionou-se cinco gotas do reativo de Kovacs, agitando-se lentamente cada tubo. A formação de um anel vermelho na superfície do meio foi observada quando o indol era produzido.

Teste do ONPG (Orto-nitrofenil-beta-D-galactopiranosideo)
para a pesquisa da Beta-Galactosidase

O meio foi preparado, conforme descrito por COSTA e HOFER (1972), pelo método de Le Minor e Hamida. Aos tubos contendo 0,2 ml do meio foi adicionada uma alça com suspensão densa do inóculo. A incubação foi feita a 37°C por 24 horas. Foi observado o aparecimento de cor amarela nos tubos positivos devido à hidrólise do ONPG e liberação do ortonitrofenol.

Após esta triagem e, de acordo com os resultados encontrados nas provas do TSI e do Indol, as culturas foram classificadas em dois grupos: culturas suspeitas de *E. coli* Indol-Positivas e Indol-Negativas.

Em cada grupo foi realizada uma série de reações complementares, descritas a seguir:

Provas realizadas com as culturas suspeitas
de *E. coli* Indol-Positivas

Voges-Proskauer (VP) (Técnica de Barrit)

O meio foi semeado e incubado a 37°C por 48 horas. A produção de acetilmetilcarbinol foi pesquisada adicionando-se 0,2 ml de solução a 40% de KOH e 0,6 ml de solução a 50% de alfa-naftol em álcool absoluto a 1 ml da cultura. Os tubos foram agitados e a seguir deixados em repouso por 5 a 30 minutos. Nos tubos VP, positivos desenvolveu-se coloração vermede

lha característica.

Descarboxilação da Lisina

O meio, contendo 1% de lisina, foi semeado e coberto com óleo mineral estéril. A incubação foi feita a 37°C por 24 a 48 horas. Os resultados foram observados por quatro dias. A descarboxilação da lisina alcalinizou o meio.

Sensibilidade ao Cianeto de Potássio (KCN)

O meio de Moeller foi inoculado com uma alçada de suspensão da cultura de maneira que não apresentassem turvação. A incubação foi feita a 37°C por 24 a 48 horas. Considerou-se positivos os tubos que se apresentaram turvos evidenciando nítido crescimento.

Fermentação do Adonitol

O meio básico para fermentação de carboidratos (COSTA e HOFER, 1972) adicionado de adonitol foi semeado e incubado a 37°C por 24 a 48 horas. Os resultados negativos foram observados até 30 dias. Foi observada a produção de ácido.

Fermentação da Glicose

O meio básico para fermentação de carboidratos (COSTA e HOFER, 1972) adicionado de glicose, foi semeado e incubado de maneira idêntica à prova anterior. Foram observados produção de ácido e de gás.

Utilização do Mucato

O meio básico para utilização de ácidos orgânicos, descrito por KAUFFMANN, 1966 e citado por COSTA e HOFER, 1972, adicionado de mucato, foi inoculado através de uma alçada de cultura de 24 horas em caldo simples, e incubado a 37°C por 24 horas. A utilização do mucato foi revelada pela reação ácida do meio.

Motilidade

Para esta prova, foi seguida a técnica de THATCHER e CLARK (1973). O meio motilidade nitrato foi semeado por picada e incubado a 37°C por 24 a 48 horas. Observou-se o tipo de crescimento, sendo considerado móveis os microrganismos que cresciam difusamente.

Provas realizadas com as culturas suspeitas de E. coli Indol-Negativas

Além das provas da Descarboxilação da Lisina, VP.,

Fermentação da Glicose, do Mucato e Motilidade, já descritas anteriormente, foram observadas:

Fermentação da Celobiose e do Sorbitol

O meio básico para fermentação de carboidratos, adicionado de celobiose ou sorbitol (COSTA e HOFER, 1972) foi semeado, incubado e observado de maneira idêntica à descrita anteriormente para outros carboidratos.

Após estas provas, as culturas que se enquadraram dentro das características para *E. coli* foram estocadas em Agar Nutritivo, recobertas com óleo mineral estéril (Nujol) e posteriormente examinadas sorologicamente, conforme técnica descrita a seguir:

3.2.3.3.3. Caracterização Sorológica

Foram verificadas apenas as composições de antígenos somáticos e capsulares ("O" e "OK"), deixando-se de pesquisar os antígenos flagelares, já que os dois primeiros são suficientes para a pesquisa pretendida. A metodologia empregada para a realização das provas sorológicas foi a descrita por EDWARDS e EWING (1972).

As culturas utilizadas provinham de crescimento de 24 horas em Agar Nutritivo inclinado. Para separar-se as culturas lisas das rugosas foram realizadas as provas da termo-

aglutinação (BURNET, 1925) e da aglutinação com solução 1:500 de Tripaflavina (ALESSANDRINI e SABATUCCI, 1931). As culturas rugosas foram ressuspensas e plaqueadas em Agar Nutritivo, na tentativa de se isolar colônias lisas. As culturas lisas foram testadas frente aos antissoros polivalentes "OK" dos grupos A, B e C (DIFCO) pela técnica de aglutinação em lâmina. Para isso, foi feita uma suspensão densa da cultura em salina fisiológica estéril. Retirou-se três gotas dessa suspensão, as quais foram colocadas em uma placa de vidro. A cada uma dessas gotas juntou-se uma gota do antissoro poli A, poli B e poli C, respectivamente. As gotas de cultura e soro foram misturadas com auxílio de alça de platina estéril e movimentos rotatórios da placa e observadas sob luz indireta sobre um fundo escuro. As culturas que aglutinaram foram consideradas positivas para o grupo A, B ou C. As negativas foram desprezadas.

A seguir, as culturas positivas foram testadas de modo idêntico à técnica anteriormente descrita, frente aos antissoros monovalente "OK" de cada grupo. Desse modo, as culturas positivas do grupo "A" foram testadas frente aos antissoros: 0111:K58; 055:K59; 026:K60. As culturas positivas para o grupo B foram testadas com antissoros: 086:K61; 0119:K69; 0124:K72; 0125:K70; 0126:K71 e 0128:K67. Finalmente, as culturas positivas para o grupo C foram testadas frente aos antissoros: 018; 044:K74; 025:K11; 091 e 0112:K66. As culturas que não aglutinaram nestes soros foram consideradas negativas e desprezadas.

As culturas positivas foram utilizadas para um teste confirmatório no qual procurou-se reafirmar a identidade do antígeno "O". A técnica utilizada foi semelhante à descrita anteriormente, isto é, aglutinação em lâmina, usando-se os mesmos soros "OK" monovalentes, apenas com a diferença que, desta vez, a suspensão da cultura em salina estéril foi aquecida até a fervura por 30 minutos, antes de ser examinada. Este aquecimento teve por finalidade destruir o antígeno "K" (capsular), deixando apenas o antígeno "O" (somático) que é termo-resistente. Após o resfriamento, as culturas foram examinadas e naquelas onde se observou a aglutinação ficou confirmada a identidade do antígeno "O".

3.2.3.3.4. Provas Bioquímicas Complementares

Com as culturas positivas para a sorologia monovalente "OK" e "O" foram realizadas mais algumas provas bioquímicas para complementar a caracterização, tais como:

Fermentação dos Carbohidratos: Lactose, Sacarose e Manitol

A técnica utilizada foi semelhante à citada anteriormente para outros carbohidratos.

Utilização do Malonato

O meio de Leifson, modificado por Ewing, Davis e Reavis (COSTA e HOFER, 1972) foi inoculado e incubado a 37°C por 48 horas. A reação positiva foi indicada pela alcalinização do meio.

Utilização do Citrato de Sódio

O meio de Simmons (COSTA e HOFER, 1972) foi inoculado através de estrias na superfície e incubado a 37°C por quatro dias. A reação positiva foi evidenciada pela alcalinização do meio.

Fenilalanina - Desaminase

O meio de Ewing, Davis e Reavis (COSTA e HOFER, 1972) foi semeado por estrias e incubado a 37°C por 18 a 24 horas. A leitura foi feita adicionando-se quatro a cinco gotas de solução aquosa a 10% de cloreto férrico a cada tubo. A reação positiva (desaminação da fenilalanina) dá origem ao ácido fenil-pirúvico que, em presença de cloreto-férrico desenvolve coloração verde.

Produção de Gelatinase

O meio de gelatina (COSTA e HOFER, 1972) foi inoculado e incubado a 37°C por 24-48 horas. Os resultados negativos

foram observados por 30 dias. A reação positiva foi evidenciada pela liquefação da gelatina, após a permanência dos tubos em temperatura de refrigeração.

3.2.3.4. Salmonella

3.2.3.4.1. Evidenciação

A pesquisa de *Salmonella* foi realizada de acordo com POELMA e SILLIKER (1976), envolvendo as seguintes etapas:

a) Pré-enriquecimento não seletivo de 50 g ou ml da amostra, adicionada de 1 ml de solução aquosa de Verde-Brilhante a 0,1%, incubada a 35°C por 18 a 24 horas. No caso específico do leite em pó, a amostra foi previamente diluída em 500 ml de água destilada estéril;

b) enriquecimento seletivo em caldo Tetrationato e Caldo Selenito Cistina, sendo o primeiro adicionado de 0,1 ml de solução aquosa de Verde-Brilhante a 0,001% por cada 10 ml do meio. O inóculo constou de 1 ml do pré-enriquecimento. A incubação foi feita a 35-37°C por 18 a 24 horas.

c) plaqueamento em Agar Verde-Brilhante (AVB), Agar *Salmonella Shigella* (ASS) e Agar Bismuto-Sulfito (ABS). O inóculo se originou de uma alçada dos meios de enriquecimento seletivo e do pré-enriquecimento. A incubação foi feita a 35-37°C por 24 horas. As colônias suspeitas de *Salmonella* foram repicadas para os meios de triagem TSI e Lisina Ferro Agar (LIA) (THATCHER e CLARK, 1973).

3.2.3.5. Bacillus cereus

3.2.3.5.1. Isolamento

A metodologia usada para o isolamento do *B. cereus* foi a descrita por GOEPFERT (1976). Para o leite pasteurizado e creme de leite retiraram-se alíquotas em duplicata de 0,1 ml da amostra original (sem diluição) e da diluição 10^{-1} que foram plaqueadas em Agar Gema de Ovo-Polimixina-Vermelho-Fenol. Para o leite em pó, as alíquotas foram retiradas a partir da diluição 10^{-1} e 10^{-2} e plaqueadas de modo idêntico. A incubação foi feita a 30°C por 45 horas. As colônias típicas de *B. cereus* (grandes, rosadas, com halo de precipitação densa sobre um fundo vermelho-violeta) foram contadas na placa de menor diluição e calculado o número presuntivo de *B. cereus* por g ou ml da amostra. Um número significativo de colônias (raiz quadrada) foi estocado em Agar Nutritivo, recoberto com óleo mineral estéril (Nujol) para posterior caracterização bioquímica.

3.2.3.5.2. Caracterização Bioquímica

Além das características microscópicas observadas (tamanho do bastonete, coloração de Gram e esporulação) foram feitas provas bioquímicas para caracterização da espécie (THATCHER e CLARK, 1973; GOEPFERT, 1976). Para isto, as culturas estocadas foram repicadas para Agar Nutritivo inclinado e in

cubadas a 30°C por 45 horas. A partir daí foram feitas as semeaduras nos meios específicos para as provas bioquímicas, que se seguem:

Fermentação do Manitol e Produção de Lecitinase

O meio Agar Gema de Ovo-Polimixina-Vermelho - Fenol foi semeado e incubado a 30°C por 45 horas. A reação positiva foi evidenciada pela produção de ácido e pela zona de precipitação em torno da colônia.

Redução do Nitrato (Prova de Griess-Ilosway)

O meio (Caldo Nitrato) foi inoculado e incubado a 30°C por 18 a 24 horas. Após este período adicionou-se 0,5 a 1 ml de solução de ácido sulfanílico e igual volume de solução de alfa-naftilamina. Os tubos foram agitados e observados. O aparecimento de cor rosa ou vermelha foi considerado sinal positivo para a redução dos nitratos.

Motilidade

Foi usado o meio acima adicionado de 0,3% de agar, incubado a 30°C por 18-24 horas. A inoculação foi realizada através de picada profunda.

Produção de Gelatinase

O meio (Gelatina Nutritiva) foi inoculado por pica da profunda e incubado a 30°C por 24 horas. A liquefação do meio indicou a produção de gelatinase.

Utilização Anaeróbica da Glicose

O meio (caldo básico para fermentação de carboidratos descrito por COSTA e HOFER, 1972) adicionado de glicose foi inoculado, coberto com óleo mineral estéril ("Nujol") e incubado a 30°C por 24 horas. A produção de ácido foi interpretada como reação positiva.

Hidrolise do Amido

Placas de Agar Amido foram semeadas em estrias e incubadas a 30°C por 24 horas. Depois foram cobertas com solução de Lugol. O aparecimento de zonas claras em volta das estrias indicou a hidrólise do amido.

Teste Voges-Proskauer

A técnica utilizada foi semelhante àquela descrita na caracterização bioquímica da *E. coli* enteropatogênica, apenas mudando a temperatura de incubação para 30°C.

Produção de Catalase

Foi colocada sobre uma lâmina uma alçada da cultura e cobriu-se com gotas de solução a 3,5% de peróxido de hidrogênio. O despreendimento de gás foi considerado positivo para produção de catalase.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. LEITE PASTEURIZADO TIPO "C"

Os resultados encontrados na análise do leite pasteurizado tipo "C", com relação a contagens de coliformes totais e fecais, *S. aureus*, *B. cereus*, bem como a presença de *E. coli* enteropatogênica e *Salmonella*, podem ser observados na Tabela 1.

Nota-se que em todas as marcas, cinco ou mais das dez amostras examinadas estavam fora dos padrões para coliformes totais. Para coliformes fecais as amostras da marca "A" estavam bem mais contaminadas, com oito das dez amostras apresentando mais de um coliforme/ml. As demais marcas tinham apenas duas amostras nesta situação. O interessante é que, apesar da marca "C" apresentar, de um modo geral, menores contagens de coliformes totais que as demais, todas as amostras estavam contaminadas com *S. aureus* em níveis que variavam de 1 a 50/ml, indicando algum problema na indústria.

A Tabela 2 fornece um quadro mais claro da situação

Tabela 1. Contagens de coliformes totais e fecais, *E. coli* enteropatogênica, *S. aureus* coagulase (+), *Salmonella* e *B. cereus* em leite pasteurizado tipo "C", coletado em Supermercados do Rio de Janeiro

Nº da Amostra	Marca	Coliformes (NMP/ml)		<i>E. coli</i> Enterop. (Sorotipo)	<i>S. aureus</i> Coag. (+) (nº/ml)	Presença de <i>Salmonella</i> (em 25 ml)	<i>B. cereus</i> (nº/ml)
		totais	fecais				
1	A	>24	>24		0	neg.	25
2		4,6	4,6		0	"	35
3		11	4,6		0	"	30
4		11	11		0	"	35
5		2,1	2,1		0	"	10
6		>24	4,6		12	"	10
7		0,15	0,09		0	"	10
8		11	0,93		7	"	5
9		11	11		14	"	5
10		>24	4,6		16	"	30
11	B	>24	0,04		0	"	25
12		0,93	0,23		0	"	0
13		>24	0,04		3	"	15
14		>24	0,07		0,5	"	15
15		>24	0		0	"	5
16		11	2,4		0	"	0
17		4,6	2,3		30	"	0
18		0,07	0		0	"	0
19		0,07	0		0	"	10
20		11	0,03		0	"	30
21	C	0,09	0		50	"	0
22		0,09	0,03		1	"	50
23		0,23	0		33	"	30
24		0,15	0,03	018	43	"	0
25		0,15	0		30	"	500
26		>24	>24		25	"	100
27		>24	0,28		24	"	0
28		11	0,15		33	"	0
29		>24	2,4		28	"	0
30		>24	0,75		20	"	0

Tabela 2. Níveis de contaminação e distribuição percentual das contagens (em n^o/ml) das 30 amostras de leite pasteurizado tipo "C"

Microorga- nismo	Contamina- ção %	0 n ^o	%	< 1 n ^o	%	1 - 5 n ^o	%	5 - 10 n ^o	%	10 - 10 ² n ^o	%	10 ² - 10 ³ n ^o	%
C. totais	100	-	-	9	30	3	10	-	-	18*	60*	-	-
C. fecais	80	6	20	12	40	8	26,7	-	-	4**	13,3	-	-
<i>S. aureus</i>	56,7	13	43,3	1	3,3	2	6,8	1	3,3	13	43,3	-	-
<i>B. cereus</i>	66,6	10	33,4	-	-	3	10	4	13,3	12	40	1	3,3

* contagens superiores a 24/ml em 11 amostras

** contagens superiores a 24/ml em 2 amostras

das amostras de leite examinadas. Pode-se notar que a contaminação por coliformes totais atingiu o nível de 100% das amostras, sendo que em 18 delas (60%) a contagem foi superior às estabelecidas pelos padrões existentes. A contaminação por coliformes fecais atingiu 80% das amostras, e em 12 (40%) a contagem foi superior aos padrões.

S. aureus coagulase positivo foi encontrado em 17 amostras (56,6%) sendo que em 13 (43,3%) as contagens foram superiores a 10/ml. *B. cereus* esteve presente em 20 amostras (66,6%), sendo a maior frequência entre $10-10^2$ cels/ml (40%) das amostras. Não encontramos referências sobre padrões para *S. aureus* e *B. cereus* em leite pasteurizado.

Analisando os resultados para coliformes totais (Tabela 2), vê-se que o percentual de 60% de amostras, fora dos padrões estabelecidos pelo M.S. e M.A., foi muito elevado. As causas que contribuíram para isto podem ser várias: a) pasteurização mal conduzida; b) higiene inadequada das tubulações, tanques e/ou equipamentos, com os quais o leite entra em contato; c) temperatura de conservação inadequada após o ensacamento, permitindo o crescimento dos microrganismos.

As seguintes ponderações podem ser feitas com base nos resultados obtidos:

1.^a) As amostras nºs 17, 21, 23, 24 e 25 (Tabela 1) apresentaram-se dentro dos padrões do M.S. para coliformes totais e fecais, contendo, entretanto, *S. aureus* em quantidades

superiores a 10/ml. Três fatos podem ter concorrido para isso:

a) a quantidade de *S. aureus* no leite cru era muito elevada (a mastite bovina pode ser uma causa freqüente deste fato, conforme relatam Mc COY, 1959; MINOR e MARTH, 1972; COVARRUBIAS e HAVERBECK, 1978), não havendo eliminação total da carga com o tratamento térmico, apesar deste ser bem enérgico (tratamento 4 ou 9D, tendo por objetivo a destruição da *Coxiella burnetii*, que possui valor $D_{150} = 0,50$ a $0,60$ min (JAY, 1978);

b) maior resistência térmica do *S. aureus* em relação à *E. coli*, conforme citação em literatura, de que os microrganismos Gram-positivos são mais resistentes às temperaturas elevadas que os Gram-negativos e que certos cocos são mais resistentes que os bastonetes (JAY, 1973). Vê-se então que se o número de *S. aureus* for muito elevado poderá ocorrer sobreviventes (DABBAH et al., 1971). Os valores D_{150} de *S. aureus* (0,20 a 2,20 min) e *Coxiella burnetii* (0,50 a 0,60 min), microrganismo de maior resistência térmica no leite, podem fornecer uma melhor idéia do que foi dito (JAY, 1978); c) contaminação pós-pasteurização, que segundo FOLTZ et al. (1960) é uma importante fonte de estafilococos no leite. Segundo os autores, devido ao fato dos estafilococos viverem no nariz e trato respiratório superior do homem, os operários de uma indústria de laticínios podem ser um reservatório de contaminação, o que vem de acordo com o que afirma MUNCH - PETERSEN (1960) que diz que o homem é, freqüentemente, a maior fonte de contaminação do leite e derivados e talvez até do úbere bo

vino.

Pela Tabela 1 podemos, ainda, observar que estas altas contagens de *S. aureus* acompanhadas de níveis de coliformes dentro dos padrões ocorreram com maior freqüência, numa só marca de leite ("C"), a qual provavelmente recebe o produto de uma mesma bacia leiteira. Levando-se em consideração este fato, reforçamos a idéia da hipótese "a" formulada anteriormente: alta carga microbiana no leite cru, certamente devida à mastite estafilocócica. A idéia de contaminação pós-pasteurização não nos parece muito viável porque, neste caso, seria lôgico que houvesse também coliformes em níveis elevados.

2.^a) Nos casos em que apenas as contagens de coliformes estavam elevadas, as hipóteses mais aceitáveis seriam a má higienização das instalações ou temperatura de armazenamento inadequada. Os coliformes não são termodúricos, sendo destruídos em uma pasteurização correta. Com aplicação constante do teste da fosfatase ao leite pasteurizado, e os sistemas de segurança dos quais são dotados os modernos pasteurizadores, os casos de pasteurização deficientes são cada vez mais escassos. Portanto, é provável que a presença de coliformes no leite pasteurizado esteja mais relacionada com a recontaminação após a pasteurização. ABELE (1966) cita alguns fatores que favorecem a esta recontaminação, tais como: a) equipamento de desenho antiquado, que dificulta a limpeza; b) lavagem de todo equipamento (tanto o utilizado para o leite cru como para o leite pasteurizado) com a mesma solução de limpeza; c) práticas anti-hi

giênicas dos operários; d) sanificação deficiente.

3.^a) Nos casos onde ocorreram a presença de coliformes e *S. aureus* em níveis elevados (amostras nºs 6, 10, 13, 14, 26, 27, 29 e 30, da Tabela 1), as hipóteses mais viáveis talvez sejam problemas de pasteurização e/ou carga microbiana do leite cru elevada, ou ainda recontaminação pós-pasteurização. Segundo COVARRUBIAS e HAVERBCK (1978) a contaminação do leite cru com o grupo coliforme começa com os latões mal higienizados onde o leite pode permanecer por períodos de até 15 horas, às vezes em temperatura acima de 25°C. Isto promove desenvolvimento bacteriano contínuo na fase estábulo-indústria leiteira e, ocorrendo falhas na pasteurização estes microrganismos podem persistir no leite pasteurizado.

Conclusões exatas sobre todas as hipóteses formuladas só poderão ser feitas após estudos experimentais aprofundados.

4.^a) Para o leite pasteurizado consumido "in natura", dentro dos padrões microbiológicos para coliformes e salmonelas a presença de *S. aureus*, nos níveis encontrados, não representa grande risco para o consumidor porque os estafilococos são incapazes de competir com as bactérias da flora normal do alimento (JAY, 1973). No caso do leite, as bactérias lácticas, presentes após a pasteurização, provavelmente, deteriorariam o produto antes que a população de *S. aureus* atingisse um nível capaz de provocar problemas (10^6 cels/ml). TATINI *et al.* (1970), entretanto, enfatizam o perigo de contaminação do lei

te após o tratamento térmico (isto é, relativamente livre de flora competitiva) e subsequente exposição à temperaturas adequadas ao crescimento do *S. aureus*. DABBAH *et al.* (1971) afirma ser possível o perigo de intoxicação alimentar com leite pasteurizado. Um outro risco é a utilização do leite contaminado como matéria-prima para confecção de doces de confeitaria, "milk-shakes", sorvetes e outros produtos. Neste caso poderá haver maior chance de multiplicação do *S. aureus* e riscos para a Saúde Pública.

5ª) Com relação ao *B. cereus*, vê-se que estão frequentemente presentes, embora em níveis baixos (Tabela 2). Isto é compreensível já que estes microrganismos são amplamente distribuídos na natureza (solo, água e ar) (JAY, 1973) e que a pasteurização não é suficiente para destruir seus esporos. A possibilidade de *B. cereus* provocar problemas de intoxicação alimentar nos níveis encontrados é muito remota, pelos mesmos motivos já expostos para o *S. aureus*.

Como linha para pesquisas futuras em leite pasteurizado, com base nos resultados obtidos pode-se sugerir: a) verificação da influência real de cada fator que interfere na carga microbiana do leite pasteurizado para saber-se qual ou quais deles são responsáveis pelo elevado percentual de amostras obsoletas fora dos padrões; b) verificação do significado da presença de *S. aureus* em amostras de leite que se apresentam dentro dos padrões microbiológicos para os demais microrganismos. Após estas pesquisas, poder-se-á fazer recomendações mais abalizadas.

lizadas para as indústrias de laticínios.

4.2. LEITE EM PÓ

Os resultados apresentados pelas amostras de leite em pó foram bem mais satisfatórios. Pela Tabela 3, pode-se observar que apenas três amostras (nºs 57, 58 e 59), de uma das marcas examinadas ("F") apresentara-se fora dos padrões microbiológicos do M.S. *Salmonella* e *S. aureus* não foram detectados em nenhuma amostra. A Tabela 4 fornece a distribuição percentual das contagens. Nota-se que coliformes totais estavam presentes em 23,3% das amostras, sendo que em três delas (10%) as contagens foram superiores ao limite do M.S. Coliformes fecais foram detectados em três amostras (10%), sendo que em duas (6,6%) em contagens superiores aos padrões do M.S. A contaminação por *B. cereus* foi bem elevada (80%) sendo que em duas amostras (6,6%) as contagens ultrapassaram a 10^3 cels/g.

LEITÃO *et al.* (1974) analisaram microbiologicamente 12 tipos de alimentos desidratados, inclusive o leite em pó, o qual também apresentou um nível de contaminação reduzido, evidenciando boas condições de processamento. Os autores encontraram coliformes totais e fecais em apenas 10% das amostras. *S. aureus* foi encontrado em 3,3% delas e *B. cereus* em 36,6%. *Salmonella* não foi encontrada em nenhuma das amostras.

Durante o processo de desidratação do leite ocorrem

Tabela 3. Contagens de coliformes totais e fecais, *E. coli* enteropatogênica, *S. aureus* coagulase (+), *Salmonella* e *B. cereus* em leite em pó, coletado em Supermercados do Rio de Janeiro

Nº da Amostra	Marca	Coliformes totais	(NMP/g) fecais	<i>E. coli</i> Enterop. (Sorotipo)	<i>S. aureus</i> Coag. (+) (nº/g)	Presença de <i>Salmonella</i> (em 25 g)	<i>B. cereus</i> (nº/g)
31	D	0	0	-	0	neg.	0
32		0	0	-	0	"	0
33		0	0	-	0	"	0
34		0	0	-	0	"	0
35		0	0	-	0	"	150
36		0	0	-	0	"	100
37		0	0	-	0	"	200
38		0	0	-	0	"	300
39		0	0	-	0	"	0
40		0	0	-	0	"	400
41	E	0	0	-	0	"	350
42		0	0	-	0	"	100
43		0	0	-	0	"	100
44		0	0	-	0	"	100
45		0	0	-	0	"	0
46		0	0	-	0	"	550
47		0	0	-	0	"	800
48		0	0	-	0	"	200
49		0	0	-	0	"	400
50		0	0	-	0	"	200
51	F	0,9	0	-	0	"	400
52		0	0	-	0	"	350
53		0	0	-	0	"	400
54		0,9	0	-	0	"	400
55		0	0	-	0	"	650
56		2,1	0	-	0	"	600
57		>240	15	-	0	"	1.950
58		>240	15	-	0	"	1.150
59		46	0,7	-	0	"	250
60		2,3	0	-	0	"	150

Tabela 4. Níveis de contaminação e distribuição percentual das contagens (em nº/ml) das 30 amostras de leite em pó

Microorga- nismo	Contam- nação %	0		< 1		1 - 5		5 - 10		10 - 10 ²		10 ² - 10 ³		> 10 ³	
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
C. totais	23,4	23	76,6	2	6,6	2	6,6	-	-	1	3,6	2	6,6	-	-
C. fecais	10	27	90	1	3,6	-	-	-	-	2	6,4	-	-	-	-
S. aureus	0	30	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B. cereus	80	6	20	-	-	-	-	-	-	4	13,6	18	60	2	6,4

dois efeitos sobre a população microbiana. O primeiro é o de concentração de células, já que o leite "in natura" contém cerca de 87% de água e o leite em pó, um máximo de 3% de umidade (RIISPOA). O segundo é o de redução da carga microbiana em decorrência das temperaturas empregadas no processo. Para os microrganismos sensíveis a estas temperaturas (coliformes, *S. aureus*, *Salmonella* e outros) este efeito predomina, havendo, portanto grande redução nas contagens. Podem ocorrer, entretanto, variações nas temperaturas empregadas nas diferentes etapas do processamento, de fábrica para fábrica. Baseados neste fato e nos efeitos citados (concentração de células e redução microbiana) os padrões microbiológicos estipulam limites superiores para coliformes totais e já admitem *S. aureus* em níveis de até 10/g. Realmente trabalhos com *S. aureus* citam sobrevivência destes em processos de desidratação. ANDERSON e STONE (1955), por exemplo, relatam que um leite concentrado (antes de passar pelo Spray-dryer) cuja contagem total era de 10^8 cels/g e apresentava cerca de 5×10^6 *S. aureus* coagulase positivo/g, teve sua carga reduzida para menos de 10^4 cels/g, permanecendo a mesma proporção de *S. aureus* coagulase positivo, após a desidratação. HOBBS (1955) cita que, após a desidratação no "Spray-dryer", a contagem total no leite em pó é bastante reduzida, embora persista um pequeno número de estafilococos. Diz ainda que a redução microbiana geralmente é de 10^3 , durante o processo de desidratação e que, portanto, se o leite em pó apresentar alta contaminação de estafilococos, isto indicará que o número destes

microrganismos era muito alto antes da desidratação e por isto talvez possa ter ocorrido produção de enterotoxina em alta concentração.

O tanque de balanceamento, por onde o leite passa antes de entrar no "Spray-dryer", é uma fonte de recontaminação do leite que já foi pasteurizado, provavelmente devido ao limo formado nas paredes deste tanque (HOBBS, 1955; ANDERSON e STONE, 1955). Outras causas de contaminação do leite em pó são as operações pós-desidratação, quando o leite em pó pode entrar em contato com superfícies contaminadas, insetos, principalmente no caso de indústrias com condições higiênicas inadequadas.

Nota-se pela Tabela 3 que, com exceção da marca "F", as demais apresentaram excelentes características microbiológicas, demonstrando boas condições de operação.

No caso do *B. cereus*, o que se pode notar claramente é um efeito de concentração após o processo de desidratação. Isto porque os esporos do microrganismo suportam as temperaturas durante o processamento. Comparando-se as Tabelas 1 e 3, observa-se que as contagens para esse microrganismo são praticamente dez vezes maiores no leite em pó, sendo que a redução de volume na desidratação gira em torno desse valor.

4.3. CREME DE LEITE

No caso do creme de leite (Tabela 5), apenas a indústria "G" apresentou sério problemas. A Tabela 5 mostra que seis amostras apresentaram contagens superiores a 10^3 cels/g para coliformes totais e quatro estavam acima deste limite para coliformes fecais. *S. aureus* também foi detectado em quatro amostras desta mesma indústria, em quantidades de 10 a 10^2 cels/g. Apesar de algumas amostras de outras marcas terem apresentado valores altos para coliformes totais, os coliformes fecais e *S. aureus* não foram detectados. *E. coli* enteropatógena foi isolada de quatro das amostras da marca "G". *Salmonella* não foi isolada e *B. cereus*, quando presente, estava em pequena quantidade.

A distribuição percentual das contagens no creme de leite pode ser observada na Tabela 6. Nota-se que os coliformes totais estavam presentes em 14 amostras (46,6%) sendo que em nove dessas (30%) a contagem foi superior a 10^3 cels/g. Coliformes fecais foram detectados em sete amostras (23,3%), sendo que em quatro (13,3%) estavam em número superior ao fixado pelos padrões existentes. *S. aureus* coagulase positiva foi encontrado em quatro amostras (13,3%).

Com respeito à presença de *E. coli* enteropatógena, a incidência foi semelhante à encontrada por SINGH e RANGANA THAN (1974) que, de 30 amostras de creme examinadas, três continham o microrganismo em questão. Os biotipos isolados

Tabela 5. Contagens de coliformes totais e fecais, *E. coli* enteropatogênica, *S. aureus* coagulase (+), *Salmonella* e *B. cereus* em creme de leite, coletado em Super-mercados do Rio de Janeiro

Nº da amostra	Marca	Coliformes totais	(NMP/g) fecais	<i>E. coli</i> Enterop. (sorotipo)	<i>S. aureus</i> coag. (+) (nº/ml)	Presença de <i>Salmonella</i> (em 25 g)	<i>B. cereus</i> n9/ml
61		>2.400	>2.400	0111:K58	74	neg.	0
62		>2.400	>2.400	-	70	"	10
63	G	0	0	-	0	"	25
64		0	0	-	0	"	30
65		1.100	1.100	0119:K69	34	"	0
66		>2.400	>2.400	026:K60	26	"	0
67		0	0	-	0	"	0
68		0	0	-	0	"	0
69		0	0	-	0	"	0
70		0	0	-	0	"	0
71		>2.400	0	-	0	"	0
72	H	>2.400	0	-	0	"	0
73		1,86	0,08	-	0	"	0
74		0	0	-	0	"	0
75		0	0	-	0	"	0
76		0	0	-	0	"	0
77		0	0	-	0	"	200
78		>2.400	0	-	0	"	0
79		420	0	-	0	"	0
80		0,86	0	-	0	"	0
81		0	0	-	0	"	0
82		0	0	-	0	"	0
83	I	0	0	-	0	"	0
84		0	0	-	0	"	0
85		0	0	-	0	"	0
86		0	0	-	0	"	0
87		>2.400	0,08	-	0	"	0
88	G	>2.400	0,18	-	0	"	0
89		0,86	0	-	0	"	0
90		24	0	-	0	"	0

Tabela 6. Níveis de contaminação e distribuição percentual das contagens (em nº/ml) das 30 amostras de creme de leite

Micror- ganismo	Contami- nação %	0 nº %	< 1 nº %	1 - 5 nº %	5 - 10 nº %	10 - 10 ² nº %	10 ² - 10 ³ nº %	> 10 ³ nº %
C. totais	46,7	16 53,3	2 6,8	1 3,3	-	1 3,3	1 3,3	9 30
C. fecais	23,4	23 76,6	3 10	-	-	-	-	4 13,4
S. aureus	13,4	26 86,6	-	-	-	4 13,4	-	-
B. cereus	13,4	26 86,6	-	-	1 3,3	2 6,8	1 3,3	-

pelos autores, foram: 026:K60, 055:K59 e 0127:K65. Já no presente trabalho, foram isolados os biotipos: 026:K60, 0111:K58 e 0119:K69.

O problema das amostras "G" foi examinado mais de perto graças à receptividade por parte da firma, após contato pessoal. A primeira grande falha encontrada foi na pasteurização. A temperatura que o creme atingia, oscilava entre 75 e 85°C, e o tempo de retenção (menos de 15 segundos) não eram suficientes para uma pasteurização perfeita. Além disto, o controle da temperatura de pasteurização era precário, o que provocava uma oscilação durante o processamento de 75 a 85°C. O tratamento térmico do creme deve ser enérgico devido ao conhecido efeito protetor da gordura sobre os microrganismos (MULVANY, 1970; JAY, 1973), sendo recomendadas temperaturas de 95 a 110°C por 10 a 15 minutos (SPREER, 1975). Constatou-se que o creme de leite cru, antes da pasteurização, possuía mais de 2.400 coliformes totais e fecais/g e 40.000 *S. aureus*/g. Na saída do pasteurizador (Temperatura de 85°C) foi coletada uma amostra e detectou-se mais de 2.400 coliformes totais/g e 24 coliformes fecais/g. *S. aureus* não foi encontrado.

Outro problema grave que estava ocorrendo era que o creme, após a pasteurização, entrava em contato com um resfriador que, além de mal higienizado, tinha um vazamento no sistema de refrigeração, permitindo o contato de água não tratada (outra falha) com o produto. Decorrente destes problemas, uma amostra de creme já maturado para o preparo de man

teiga, coletada nesta indústria, apresentou contagens de coli formes totais e fecais superiores a 2.400/g e *S. aureus* em nível já perigoso (115.000 cels/g).

Após orientações dadas, o produto passou a ter uma contagem dentro dos padrões.

4.4. PROVAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE *E. coli*

Foram isoladas 366 culturas suspeitas de *E. coli*, das placas de Ágar EMB e Mc Conkey, as quais foram submetidas a uma triagem, cujos resultados podem ser observados na Tabela 7.

A resposta característica da *E. coli* e essas provas, segundo MEHLMAN *et al.* (1974) é:

Provas	Respostas
Reação no TSI	
Fermentação	+
Produção de H ₂ S	-
Produção de gás	+ ou -
Fermentação da Arabinose	+
Produção de Urease	-
Produção de Indol	+ ou -
Hidrólise do ONPG	+

Observa-se, pela Tabela 7, que somente 219 culturas apresentaram-se dentro desses padrões, sendo 184 (84%) Indol-positivas e 35 (16%) Indol-negativas.

Segundo MEHLMAN *et al.* (1974) culturas que dessem resultado negativo para o TSI em 24 horas seriam suspeitas de *Shigella* ou *Alkalescens-Dispar*. Não obtivemos nenhum resultado semelhante.

As culturas que se apresentaram dentro dos padrões característicos para *E. coli*, foram submetidas a uma nova sequência de provas para complementar a caracterização bioquímica (Tabela 8).

Segundo MEHLMAN *et al.* (1974) a resposta característica da *E. coli* a essas provas é:

Provas	Respostas
Testes Voges-Proskauer	-
Descarboxilase da lisina	+ ou - (80% +)
Sensibilidade ao KCN	-
Fermentação da Glucose	
c/produção de gás	+ ou - (90% +)
Utilização do Mucato	+
Motilidade	+ ou -
Fermentação da celobiose	-
Fermentação do Sorbitol	+
Fermentação do Adonitol	-

Tabela 7. Características bioquímicas observadas nas provas de triagem, realizadas em 366 culturas suspeitas de *E. coli* do Agar EMB e Mc Conkey, a partir dos produtos analisados (leite pasteurizado, tipo C, leite em pó e creme de leite).

Nº de Culturas	%	T S I			Arabi nose	Urease	Indol	ONPG	Reação
		Haste	Base	H ₂ S					
219	59,8	+	+	-	+a	-	+b	+	Típica
147	40,2	±	+	-	±	+	±	±	Atípica

a = 36,5 % positivas

b = 84,0 % positivas

Tabela 8. Características bioquímicas complementares observadas em 184 culturas suspeitas de *E. coli* indol-positivas e 35 indol-negativas

Reação no Indol	Nº de Culturas	%	V.P.	Caracterização Bioquímica						
				LIS	KCN	ADON.	GLUC.	MUC.	MOTIL.	CELOB. SORB. REAÇÃO
Culturas Positivas	170	92,3	-	^a +	-	^b +	+	^c +	^d +	NR NR Típica
	14	7,6	+	+	+	+	+	+	+	NR NR Atípica
Culturas Negativas	35	100%	-	^e +	-	NR	+	^f +	^g +	^h + ⁱ Típica

a = 97,6% positivas
b = 98,8%
c = 64,1%
d = 92,9%

e = 2,8% positivos
f = 60%
g = 20%
h = 22,8%

i = 2,8% positivos
NR = Não Realizadas

Entre as culturas suspeitas de *E. coli* Indol-positivas, apenas 59 apresentaram tais características, e entre as Indol-negativas, apenas uma. Estas culturas foram, então, selecionadas para o exame sorológico. Além destas, incluímos mais algumas que se apresentaram fora destas características apenas na prova de fermentação de carboidratos (Adonitol, Celobiose ou Sorbitol) ou na utilização do mucato. Isto se deve ao fato de que, no trabalho de SAKAZAKI *et al.* (1967) há citação de biotipos enteropatogênicos de *E. coli* negativos para a prova do mucato e sorbitol e, no trabalho de ORSKOV e ORSKOV (1977) biotipos positivos para a prova do Adonitol.

Desse modo, pode-se observar, na Tabela 8, que 170 culturas foram consideradas como tendo reação típica para *E. coli* enteropatogênica entre as culturas Indol-positivas e 35 entre as Indol-negativas. Assim, 205 culturas foram testadas sorologicamente.

Na Tabela 9 temos os resultados para os testes de aglutinação na Tripaflavina e com os soros polivalentes a que foram submetidas as culturas. A positividade em mais de um soro polivalente pode ser explicada pelas interrelações sorológicas existentes entre os antígenos somáticos e capsulares, isto é a presença de um antígeno comum a dois grupos diferentes (MEHLMAN *et al.*, 1974). Observa-se que 42 culturas (57%) mostraram-se negativas à sorologia polivalente. Os grupos sorológicos polivalentes predominantes foram B e C.

Na Tabela 10 estão os resultados encontrados para as provas sorológicas com soros monovalentes "OK". Observa-se que as três culturas positivas na sorologia Polí A, mostraram-se positivas também na sorologia monovalente "OK" e "O", sendo caracterizado os biotipos 0111:K58 e 026:K60.

Tabela 10. Reação frente aos soros monovalentes "OK" e "O" de 46 culturas de *E. coli* positivas na sorologia polivalente

Grupo Polivalente	Sorologia "OK"		Sorologia "O"		Origem das Culturas
	Soros Testados	Nº Culturas Positivas	Nº Culturas Positivas		
A	0111:K58	1	1		C. Leite
	055:K59	-	-		
	0127:K65	-	-		
	026:K60	2	2		C. Leite
B	086:K61	-	-		
	0119:K69	3	2		C. Leite
	0124:K72	-	-		
	0125:K70	-	-		
	0126:K71	1	-		L. em pó
	0128:K67	2	-		L. Pasteurizado
C	018	1	1		L. Pasteurizado
	044:K74	-	-		
	025:K11	-	-		
	091	-	-		
	0112:K66	-	-		

Das dez culturas positivas para a sorologia Poli B, apenas seis aglutinaram com os soros monovalentes "OK" e destas, apenas duas mostraram-se positivas quando testadas para identificar o antígeno "O". O biotipo encontrado foi o 0119:K69.

O fato de uma cultura aglutinar num soro monovalente "OK" e não aglutinar no mesmo soro quando destruimos o antígeno "K" pode ser explicado pelas muitas combinações existentes entre os antígenos "O" e "K", isto é, um antígeno "K" pode ser comum a dois antígenos "O" diferentes.

Do grupo Poli C, apenas uma cultura se mostrou positiva na sorologia monovalente, caracterizando o biotipo 018.

Na Tabela 11, encontram-se as características bioquímicas dos biotipos enteropatogênicos de *E. coli* isolados, sendo três originados do creme de leite (0111:K58, 026:K60, 0119:K69) e um do leite pasteurizado (018).

Os biotipos 026:K60, 0111:K58 e 0119:K69 são citados na literatura como enteropatogênicos, isolados diversas vezes de diarreias em crianças e adultos (KESSNER *et al.* 1962; SAKAZAKI *et al.*, 1967; OGAWA *et al.*, 1968; PUNYASHTHITI e FINKELSTEIN, 1971; SACK, 1975; DONTA *et al.*, 1977; ØRSKOV *et al.*, 1977). Os biotipos 026:K60 e 0111:K58 são apontados, entre outros, como muito freqüentes em gastroenterites infantis (SAKAZAKI *et al.*, 1967).

Segundo KESSNER *et al.* (1962) o biotipo 0111:K58 foi

Tabela 11. Caracterização bioquímica dos biotipos enteropatogênicos de *E. coli* isolados das amostras de leite pasteurizado e creme de leite

Grupo Composi- ção anti- poli- valen- te	Caracterização Bioquímica																			
	FERM. TSI	H ₂ S TSI	GÁS TSI	ARAB.	UR.	IMD.	ONPG.	V.P.	LIS	KCN	ADON	GLU	MUC	MOT	LAC	MAN	SAC	MAL	CIT	FA
A 0111:K58	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
A 026:K60	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
B 0119:K69	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
C 018	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+

responsável por 5,9% de mortalidades em 1.313 crianças hospitalizadas com gastroenterite, nos anos de 1960 e 1961. Os recém-nascidos foram os mais atingidos, com uma mortalidade em torno de 16%.

O biotipo 018 foi encontrado em infecções extra-intestinais (septicemias) e em fezes de crianças e adultos saudáveis (ØRSKOV *et al.*, 1977).

Quanto à caracterização bioquímica, foram encontradas algumas divergências com respeito às provas de utilização do mucato, do malonato e do citrato (Tabela 11). Na prova do mucato foram encontradas respostas negativas, enquanto COSTA e HOFER (1972), MEHLMAN *et al.* (1974) e ØRSKOV (1974) citam que deveriam ser positivas. Apenas no trabalho de SAKAZAKI *et al.* (1967) encontramos citação de cepas enteropatogênicas de *E. coli* mucato-negativas. Na prova da utilização do malonato e do citrato, encontramos resultados negativos e positivos, embora COSTA e HOFER (1972) e ØRSKOV (1974) citem somente resultados negativos. O resultado positivo na prova do citrato pode ser explicado como um tipo intermediário de *E. coli* (FISHBEIN *et al.*, 1976).

4.5. PROVAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO DO *B. cereus*

A Tabela 12 mostra os resultados das provas bioquímicas realizadas com as culturas suspeitas de *B. cereus*. Obser

Tabela 12. Resultado das provas bioquímicas realizadas com 222 culturas suspeitas de *B. cereus* isoladas a partir dos produtos analisados

Nº de Culturas	%	Caracterização Bioquímica						Reação
		Manitol	Catalase	Nitrato	Motilidade	Gelatinase	Glucose	Hidrólise V.P. Amido
175	78,8	-	+	+	+	+	+	+ ^a -
47	21,1	±	+	±	+	±	+	+ -
								Típica
								Atípica

a = 61,7% positivas

va-se que as 175 culturas isoladas cujas características morfo-tintoriais foram as de bastonetes Gram-positivos, com mais de 0,9 μ de diâmetro, esporulados, enquadraram-se dentro das reações típicas de *B. cereus*, tais como: positividade nas provas da catalase, redução do nitrato, hidrólise da gelatina, fermentação anaeróbica da glucose e reação Voges - Proskauer (VP). Quanto às provas da motilidade e hidrólise do amido 50 a 90% das cepas de *B. cereus* são positivas (LeMILLE *et al.*, 1969; THATCHER e CLARK, 1973; GOEPFERT, 1976).

4.6. PROVAS REALIZADAS COM AS CULTURAS DE *S. aureus*

Foram realizadas as provas da pesquisa da coagulase e da desoxirribonuclease (DNase) para evidenciação do *S. aureus* potencialmente patogênico, por existir uma estreita correlação entre a produção destas enzimas e da enterotoxina (THATCHER e CLARK, 1973). LACHICA *et al.* (1971) observaram que 95% de 251 cepas produtoras de enterotoxina produzem a DNase e 93% produzem a coagulase. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 13.

Como pode ser notado, ocorreu uma grande correlação entre a produção de coagulase e DNase (total e termo-estável).

Tabela 13. Resultado das Provas de Coagulase e Desoxirribonuclease (DNase) Total e Termo-estável realizadas com 110 culturas de *S. aureus* isoladas a partir de produtos analisados

Culturas Nº	%	Coagulase	DNase Total	DNase Termo-estável
81	73,6	+	+	+
3	2,7	+	-	-
26	23,6	-	-	-

5. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos pode-se concluir que:

1) foi elevada a incidência de coliformes totais e fecais, em números superiores aos Padrões Microbiológicos em vigência, no leite pasteurizado tipo "C" encontrado no comércio;

2) a incidência de *S. aureus* em leite pasteurizado foi freqüente, porém em baixos níveis;

3) a freqüência de *E. coli* enteropatogênica foi baixa nos produtos pesquisados;

4) *B. cereus* foi freqüentemente encontrado, em baixo número, em leite pasteurizado. No leite em pó, além de ser freqüente sua presença, as contagens parecem demonstrar que não há redução do número desses microrganismos no processo de secagem;

5) a presença de patogênicos como *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli* enteropatogênica nos produtos estudados, representa

senta perigo potencial para a saúde pública, no sentido de poderem produzir toxinfecções de origem alimentar;

6) não foi possível o isolamento de *Salmonella* de nenhum dos produtos pesquisados.

6. RESUMO

Com o objetivo de se avaliar a qualidade microbiológica, no que diz respeito à Saúde Pública, de alguns produtos de laticínio encontrados no comércio do Rio de Janeiro, foram analisadas 30 amostras de leite pasteurizado tipo "C", 30 de leite em pó integral e 30 de creme de leite, no período de 24/7/78 e 30/7/79.

Foram realizados: contagem (NMP) de coliformes totais e fecais, pesquisa de *Escherichia coli* enteropatogênica, pesquisa de *Salmonella*, contagem de *Staphylococcus aureus* e de *Bacillus cereus*.

Comparando-se os resultados obtidos com os padrões microbiológicos do Ministério da Saúde e do Ministério da Agricultura, observou-se que:

a) o leite pasteurizado tipo "C" apresentou-se fora dos padrões estabelecidos para coliformes totais em 60% de suas amostras e fecais em 40%. *S. aureus* coagulase positivo foi encontrado em 57% das amostras e *B. cereus* em 63%;

b) o leite em pó apresentou-se fora dos padrões estabelecidos para coliformes totais (10%) e fecais (7%). A contaminação por *B. cereus* foi bem alta (80%); das amostras;

c) o creme de leite apresentou-se fora dos padrões estabelecidos para coliformes fecais (13% das amostras) e para *S. aureus* coagulase positivo (17%);

d) quatro biotipos enteropatogênicos de *E. coli* foram encontrados: 018 (em leite pasteurizado), 026:K60; 0111:K58 e 0119:K69 (em creme de leite);

e) *Salmonella* não foi isolada em nenhum dos produtos analisados.

De um modo geral, o produto que requer maior atenção, por parte da fiscalização, é o leite pasteurizado tipo "C".

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELE, C.A., 1966. O controle dos organismos coliformes. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes*, 21(125):28-31.
- ABELE, C.A., 1966. O controle dos organismos coliformes. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes*, 21(126):14-18.
- ANDERSON, P.H.R. & STONE, D.M., 1955. Staphylococcal food poisoning associated with spray-dried milk. *J. Hyg.*, 53: 387-397.
- ARMIJO, R.; HENDERSON, D.A.; TIMOTHEE, R. & ROBINSON, H.B. , 1957. Food poisoning outbreaks associated with spray-dried milk and epidemiologic study. *Am. J. Publ. Health*. 47:1093-1100.
- BAIRD-PARKER, 1974. *Staphylococcus*.; In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8^a ed. Buchanan, R.E. e Gibbons, N.E. Baltimore.

- BIRZU, A.; FISITA, C.; GALANTEANU, M.; ONCIU, C. & DINGA, V., 1968. Toxi-infection alimentaire par *B. cereus*. *Étude de Laboratoire. Evol. Med.*, 12:591-594 (*Biol. Abstract*, 51: 8999, 1970).
- BLACK, R.E.; COX, R.C. & HORWITZ, M.A., 1978. Outbreaks of food-borne disease in the U.S. in 1975. *J. Infect. Dis.*, 137(2):213-218.
- BRYAN, F.L., 1974. Microbiological food hazards today. *Food Techn.*, 9:52-66.
- CAUDILL, F.W. & MEYER, M.A., 1943. An Epidemic of Food poisoning due to pasteurized milk. *J. Milk Technol.*, 6:73-76.
- CHOUDHERY, A.K. & MIKOŁOJCZAK, E.M., 1971. Bacilli in Milk. 2 - Sweet Curd Formation. *J. Dairy Sci.*, 54(3):321-325.
- CHRISTIANSEN, O.; KOCH, S.O. & MADELUNG, P., 1951. Et udbrud af levnedsmiddelforgiftning forårsaget af *Bacillus cereus*. *Nord. Veterinar. Med.*, 3:194-202.
- COCKBURN, W.C., 1950. Food poisoning in England and Wales, 1949. *Monthly Bull. Min. Health. Public Health Lab. Serv.* 9:254-269.
- C.N.N.P.A. - COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS, 1978. *Min. Saúde. Resolução nº 13/78.*

- COSTA, G.A. & HOFER, E., 1972. Isolamento e Identificação de Enterobactérias. *Apostilha do Inst. Oswaldo Cruz*.
- COVARRUBIAS, M.P. & HAVERBECK, J., 1978. Variações na qualidade do leite cru fase estábulo-indústria leiteira. *Rev. Inst. de Laticínios Cândido Tostes*, 33(195):3-11.
- COWAN, S.T., 1974. Enterobacteriaceae. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8a. ed. Williams e Wilkins Co. Baltimore, p. 290-332.
- DABBAH, R.; MOATS, W.A.; EDWARDS, V.M., 1971. Heat Survivor curves of food-borne Bacteria suspended in commercially sterilized whole milk. II - Bacteria other than *Salmonellae*. *J. Dairy Sci.*, 54(12):1772-1779.
- DECUM, M.; TOMESCU, V.; ROSIE, A., 1974. Serotypes of *E. coli* isolated from milk and from some sources of milk contamination. *Igiene*, 23(5):297-302.
- DONNELLY, C.B.; LESLIE, J.E. & BLACK, L.A., 1966. Production of enterotoxin A in milk. *Bacteriol. Proc.*, p.13.
- DONOVAN, K.O., 1959. The occurrence of *B. cereus* in milk and on dairy equipment. *J. appl. Bacteriol.*, 22:131-137.
- DONTA, S.T.; WALLACE, R.B.; WHIPP, S.C. & OLARTE, J., 1977. Enterotoxigenic *E. coli* and diarrheal disease in Mexican children. *J. Infect Dis.*, 135(3):482-485.

- DRYSDALE, A., 1950. *S. aureus* food poisoning. An account of an outbreak in Khartoun. *J. Trop. Med. Hyg.*, 53:12-14.
- EDWARDS, P.R. & EWING, W.H., 1972. Identification of Enterobacteriaceae. 3a. ed. Burges Publishing Co. USA.
- FANTASIA, L.D.; MESTRANDREA, L.; SCHRADE, J.P. & YAGER, J. , 1975. Detection and growth of enteropathogenic *E. coli* in soft ripened cheese. *J. Appl. Microbiol.*, 29:179-185.
- FISHBEIN, M.; MEHLMAN, I.J.; CHUGG, L. & OLSON, JR., C., 1976. Coliforms, fecal coliforms, *E. coli* and enteropathogenic *E. coli*. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. APHA. Marvin L. Speack, ed. Washington D.C., p. 277-298.
- FOLTZ, V.D.; MICKELSEN, R.; MARTIN, W.H. & HUNTER, C.A., 1960. Incidence of potentially pathogenic staphylococci in dairy products at the consumer level. I. Fluid Milk and Fluid Milk by-Products. *J. Milk Food Technol.*, 23(9):280-284.
- GIBSON, T. & GORDON, R.E., 1974. Genus *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8a. ed. Williams & Wilkins Co. Baltimore, p. 529-550.
- GOEPFERT, J.M.; SPIRA, W.M. & KIM, U.H., 1972. *Bacillus cereus*: food poisoning organism. A review. *J. Milk Food Technol.*, 35(4):213-227.

- GOEPFERT, J.M., 1976. *Bacillus cereus*. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. APHA Marvin L. Speck. (ed) Washington, D.C.
- GURWITH, M.J.; WISEMAN, D.A. & CHOW, P., 1977. Clinical and Laboratory Assessment of the pathogenicity of serotype enteropathogenic *E. coli*. *J. Infect Diseases*, 135(5):736 - 743.
- HACKLER, J.F., 1939. Outbreak of *Staphylococcus* milk poisoning in pasteurized milk. *Am. Journal of Public Health.*, 29:1247-1249.
- HALL, H.E.; BROWN, D.F.; LEVIS, K.H., 1967. Examination of Market foods for coliform organisms. *Applied Microb*, 15 (5):1062-1069.
- HAUGE, S., 1955. Food poisoning caused by aerobic spore forming bacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 18:591-595.
- HOBBS, B.C., 1955. Public health problems associated with the manufacture of dried milk. I - Staphylococcal food poisoning. *J. Appl. Bacteriol.*, 18:484-492.
- HOBBS, B.C., 1962. Staphylococcal and *Clostridium welchii* food poisoning. In: Food poisoning. Royal Society of Health, London, p.49-59.

HUTCHINSON, R.I., 1964. Milk-borne outbreak of *Salmonella heidelberg*. *Brit. Med. J.*, 5381:479-480.

IONESCU, G.; LENISTCA, C. & IONESCU, C., 1966. Freeventa *B. cereus* in laptele crud si in laptele pasteurizat. *Microbiol. Parazitol. Epidemiol.*, 11:423-430 (*Biol. Abstract*, 49: 882, 1968).

JAY, J.M., 1973. *Microbiologia Moderna de los alimentos*. Ed. Acribia Zaragoza España.

JAY, J.M., 1978. Food Preservation by use of high temperatures. In: *Modern Food Microbiology*. 2a. ed. Van Nostrand Co. N.Y.

JAYNE - WILLIAMS, D.J. & FRANKLIN, J.G., 1960. *Bacillus* spores in milk - I - *Dairy Sci. Abst.*, 22(6):215-221.

KAUFFMANN, 1966. *The bacteriology of Enterobacteriaceae*. Copenhagen Munksgaard.

KESSNER, D.M.; SHAVGHNESSY, H.J.; GOOGINS, J.; RASMUSSEN, C.M.; ROSE, N.J.; MARSHALL, JR. A. L.; ANDELMAN, S.L.; HALL, J. B. & ROSEBLOON, P.J., 1962. An extensive community outbreak of diarrhea due to enteropathogenic *E. coli.*, 0111 : B4. *Am. J. Hyg.*, 76:27-41.

- KIM, H.U. & GOEPFERT, J.M., 1971. Enumeration and identification of *B. cereus* in foods. I - 24 hour presumptive test medium. *Appl. Microbiol.*, 22:581-587.
- KNOX, W.A.; GALBRAITH, N.S.; LEVIS, M.J.; HICKIE, G.C. & JOHNSON H.H., 1963. A milk-borne outbreak of food poisoning due to *Salmonella heidelberg*, *J. Hyg.*, 61:175-185.
- LACHICA, R.V.F.; GENIGEORGIS, C. & HOEPRICH, P.D., 1971. Metachromatic Agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.*, 21(4):585 - 587.
- LEITÃO, M.F.F.; DELAZARI, I. & MAZZONI, H., 1974. Microbiologia de Alimentos Desidratados. *Coletanea do Inst. de Tec. de Alimentos*, vol. 5, p.223-241.
- LEITÃO, M.F.F., 1979. Salmonelas em águas fluviais e em alimentos não processados e industrializados de origem animal e vegetal no Est. de São Paulo. *Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da U.S.P.*
- LEMILLE, F.; BARJAC, H. & BONNEFOI, A., 1969. Essai sur la classification biochimique de 97 bacillus du group I. Appartenant a 9 especes differents. *Annales Inst. Pasteur* 116:808-819.

- LE MINOR & ROHDE, 1974: *Salmonella* In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8a. ed. Buchanan R.E. e Gibbons N.E. Baltimore, p. 298-318.
- MARIER, R.; WELLS, J.G.; SWANSON, R.C.; CALLAHAN, W.; MEHLMAN, I.J., 1973. An outbreak of enteropathogenic *E. coli* food borne disease traced to imported French cheese. *Lancet* II, 1376-1378.
- MARTH, E.H., 1969. Salmonellae and salmonellosis associated with milk and milk products. A review. *J. Dairy Sci.*, 52 (3):283-315.
- MCCOY, E., 1959. Staphylococcal problems in the dairy industry. *Milk Products J.*, 50:14-16.
- MCCOY, J.H., 1975. Trends in *Salmonella* food-poisoning in England and wales 1941.72. *J. Hyg.*, 74:271-282.
- MCNAUGHT, W. & ROBERTS, G.B.S., 1958. Enteropathogenic effects of strains of *Bacterium coli* isolated from cases of gastroenteritis. *J. Path. Bact.*, 76:155-158.
- MELHMAN, I.J.; SANDERS, A.C.; SIMON, N.T. & OLSON JR., J.C. , 1974. Methodology for recovery and identification of Enteropathogenic *E. coli*. *J. of the AOAC*, 57(1):101-110.

- MEYER, R., 1951. Über zwei nahrungsmittelvergiftungen durch keime der mesentericus-subtilis-gruppe. *Zeit Hyg.*, 133 : 211-216.
- MIDURA, T.; GERBER, M.; WOOD, R. & LEONARD, A.R., 1970. Out-break of food poisoning caused by *B. cereus*. *Public Health Rep.*, 85:45-48.
- MINOR, T.E. & MARTH, E.H., 1971. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food intoxications. A review. I. The staphylococci: characteristics, isolation, and behavior in artificial media. *J. Milk Food Technol.*, 34(11):557-564.
- MINOR, T.E. & MARTH, E.H., 1972. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food intoxication. A review. III. Staphylococci in dairy foods. *J. Milk Food Technol.*, 35(2):77-82.
- MOSSEL, D.A.A., 1975. Food transmitted diseases of microbial origin. In: *Microbiology of Foods and Dairy Products*. CRC Press Inc. Cleveland, OHIO, USA.
- MULVANY, J.L., 1970. Indústria da Manteiga. Publicado pelo Inst. de Laticínio Cândido Tostes.
- MUNCH-PETERSEN, E., 1960. Food-borne epidemics due to staphylococci. *Australian J. Dairy Technol.*, 15:25-34.
- MUNCH-PETERSEN, E., 1963. Staphylococci in food and food intoxication. *J. Food. Sci.*, 28:692-710.

- NYGREN, B., 1962. Phospholipase C-producing bacteria and food poisoning. An experimental study on *Clostridium perfringens* and *B. cereus*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*, 56, Suppl. 160:1-89.
- OGAWA, H.; NAKAMURA, A. & SAKAZAKI, R., 1968. Pathogenic properties of enteropathogenic *E. coli* from diarrheal children and adults. *Jap. J. of Med. Sci. and Biol.*, 21:333-342.
- ORSKOV, F., 1974. Genus *Escherichia* In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8a. ed. Buchanan R.E. & Gibbons N.E. Williams & Wilkins Co. Baltimore, p.293-296.
- ORSKOV, I. & ORSKOV, F., 1977. Special O:K:H serotypes among enterotoxigenic *E. coli* strains from diarrhea in adults and children. *Med. Microbiol. Immunol.*, 163:99-110.
- ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; JANN, B. & JANN, K., 1977. Serology, Chemistry and Genetics of "O" and "K" antigens of *E. coli*. *Bacteriol. Reviews*, 41(3):667-710.
- ORMAY, L. & NOVOTNY, T., 1968. The significance of *B. cereus* food poisoning in Hungary. *Proc. VI Intern. Symp. Food Microbiol.*, p. 279-285.
- ORMAY, L. & NOVOTNY, T., 1970. Über sogenannte unspezifische lebensmittelvergiftungen in Ungarn. *Zentralbl. Bakteriologie I Orig.*, 215:84-89.

- PERRIELLO, R.C., 1944. A gastroenteritis outbreak from food. *J. Milk Technology*, 7:68-72.
- PETERSON, A.; BLACK, J. & GUNDERSON, M.L., 1962. *Staphylococ*ci in competition. I. Growth of naturally occurring mixed populations in precooked frozen foods during defrost. *Appl. Microbiol.*, 10:16-22,
- POELMA, P.L. & SILLIKER, J.H., 1976. *Salmonella*. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Marvin L. Speck, ed. Am. Public Health Association (APHA). Washington, DC, p. 301-328.
- POTTER, M.N., 1967. *Salmonella* contamination. *Amer. Dairy Rev.*, 29(9):70-76.
- PROST, E. & RIEMANN, H., 1967. Food-borne salmonellosis. *Ann. Rev. Microbiol.*, 21:495-528.
- PUNYASHTHITI, K.Y. & FINKELSTEIN, R.A., 1971. Enteropathogenicity of *E. coli*. *Infect and immunity*, 4(4):473-478.
- RIISPOA (REGULAMENTO DE INSPEÇÃO INDUSTRIAL E SANITÁRIA DOS PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL), 1962. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Minist. da Agricultura*.
- SACK, R.B., 1975. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *E. coli*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 29:333-353.

- SACK, R.B.; SACK, D.A.; MEHLMAN, I.J. & ORSKOV, I., 1977. Enterotoxigenic *E. coli* isolated from foods. *J. Infect. Dis.* 135(2):313-317.
- SAKAZAKI, R.; TAMURA, K. & SAITO, M., 1967. Enteropathogenic *E. coli* associated with diarrhea in children and adults. *Japan J. Med. Sci. Biol.*, 20:387-399.
- SEITZ, M., 1913. Pathogener *B. subtilis*. *Zentralbl. Bakteriologie, I Orig.*, 70:113-114.
- SHEHATA, T.E. & COLLINS, E.B., 1971. Isolation and Identification of psychrophilic species of *Bacillus* from milk. *Appl. Microb.*, 21:466-469.
- SINGH, R.S. & RANGANATHAN, B., 1974. Occurrence of enteropathogenic *E. coli* serotypes in milk and milk products. *Milchwissenschaft*, 29(9):529-532.
- SIPA - SECRETARIA DE INSPEÇÃO DE PRODUTO ANIMAL. Ministério da Agricultura. Portaria 005 de 24/04/80. Normas para produção e beneficiamento de leite pasteurizado para consumo direto.
- SPIRA, W.M. & GOEPFERT, J.M., 1972. *Bacillus cereus* -Induced Fluid Accumulation in Rabbit Heal Loops. *Appl. Microbiol.*, 24(3):341-348.

- SPREER, E., 1975. *Lactologia Industrial*. 2a. ed. Editora Acribia Zaragoza, España.
- SNYDER, I.S.; JOHNSON, W. & ZOTTOLA, E.A., 1978. Significant Pathogens in Dairy Products. In: *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 14th ed. Marth E.H. Am. Public Health Association (APHA), Washington, DC.
- SOUTH, M.A., 1971. Enteropathogenic *E. coli* disease: New developments and perspectives. *J. Pediatr.*, 79:1-9.
- STONE, M.J., 1952. The action of the lecithinase of *B. cereus* on the globule membranes of milk fat. *J. Dairy Res.*, 19: 311-315.
- STONE, M.J. & ROWLANDS, A., 1952. "Broken" or "bitty" cream in raw and pasteurized milk. *J. Dairy Res.*, 19:51-62.
- TATINI, S.R.; JEZESKI, J.J.; OLSON, J.C. & CASMAN, E.P., 1971. Factors influencing the production of staphylococcal enterotoxin A in milk. *J. Dairy Sci.*, 54(3):312-320.
- TAYLOR JR., A.; SANTIAGO, A.; GONZALEZ-CORTEZ, A. & GANGAROSA, E.J., 1974. Outbreak of typhoid fever in Trinidad in 1971 traced to a commercial ice-cream product. *Am. J. Epidemiol.* 100:150-157.

- THATCHER, F.S. & CLARK, D.S., 1973. Bactérias Produtoras de Toxi-Infecciones alimentárias. In: Analisis Microbiológico de Los Alimentos. Editora Acribia. Zaragoza, España.
- THOMPSON, S., 1955. The role of certain varieties of *Bacterium coli* in gastroenteritis of babies. *J. Hyg.*, 53:357-367.
- TRABULSI, L.R.; FERNANDES, M.R.F. & ZULIANI, M.E., 1967. Novas bactérias patogênicas para o intestino do homem. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, 9(1):31-39.
- U.S. PUBLIC HEALTH LAB. SERV., 1950. Food poisoning in England and Wales, 1941-1948. *Monthly Bull. Min. Health. Public. Health Lab. Serv.*, 9:148-156.
- U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE, 1974. Human *Salmonella dublin* infections associated with consumption of certified rawmilk: Morbidity and Mortality Weekly Rep., 23:175-176.
- U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE, 1976. Milk-borne *Salmonella* infection - United Kingdom. Morbidity and Mortality Weekly Rep., 25:203-205.
- VEISSEYRE, R., 1972. Lactologia Técnica. 2a. ed. Ed. Acribia Zaragoza, España.

VLAD, A., 1972. Food poisoning due to *B. cereus*. *Microbiol. Parazitol. Epidemiologia*, 6:531-536 (*Dairy Sci. Abst.*, 35: 123).

WIENEKE, A.A., 1974. Enterotoxin production by strains of *S. aureus* isolated from foods and human beings. *J. Hyg.*, 73 (2):255-262.