

ALINE RAABY FERREIRA CLAUDINO

**PESQUISA DE *Salmonella* spp. EM QUEIJOS DE COALHO
COMERCIALIZADOS EM FEIRAS LIVRES DE GARANHUNS-PE**

GARANHUNS-PE

2018

ALINE RAABY FERREIRA CLAUDINO

**PESQUISA DE *Salmonella* spp. EM QUEIJOS DE COALHO
COMERCIALIZADOS EM FEIRAS LIVRES DE GARANHUNS-PE**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Medicina Veterinária da Unidade
Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal
Rural de Pernambuco como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de graduação em
Medicina Veterinária.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

GARANHUNS-PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

C615p Claudino, Aline Raaby Ferreira

Pesquisa de *Salmonella* spp. em queijos de coalho comercializados em feiras livres de Garanhuns - PE / Aline Raaby Ferreira Claudino. - 2018. 49 f.

Orientador: Marcelo Mendonça
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Garanhuns, BR-PE, 2018. Inclui referências

1. Salmonelose 2. Queijo 3. Saúde Pública
I. Mendonça, Marcelo, orient. II. Título

CDD 576.163

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PESQUISA DE *Salmonella* spp. EM QUEIJOS DE COALHO
COMERCIALIZADOS EM FEIRAS LIVRES DE GARANHUNS-PE**

Trabalho de conclusão de curso elaborado por:

ALINE RAABY FERREIRA CLAUDINO

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE

Dra. Karla Sequeira Mendonça

Med. Vet. Ana Erundina de Luna Moraes Leite

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS

FOLHA COM A IDENTIFICAÇÃO DO ESO

I. ESTAGIÁRIO

NOME: Aline Raaby Ferreira Claudino

MATRÍCULA Nº 10154052400

CURSO: Medicina Veterinária

PERÍODO LETIVO: 2017.2

ENDEREÇO PARA CONTATO: Rua São Miguel, nº. 614, Boa Vista, Garanhuns/PE.

FONE: (87) 9-9953-1551

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

SUPERVISOR: Ana Maria Camelo Travassos de Arruda

FORMAÇÃO: Biologia

II. EMPRESA/INSTITUIÇÃO

NOME: Laboratório de Análises de Alimentos, Águas e Ambiente

ENDEREÇO: R. Doutor José Mariano, 503, 1º andar - Centro.

CIDADE: Garanhuns

ESTADO: Pernambuco

CEP: 55295-335

FONE: (87) 3762-0266

III. FREQUÊNCIA

INÍCIO E TÉRMINO DO ESTÁGIO: 02/10/2017 a 31/10/2017

TOTAL DE HORAS ESTAGIADAS: 168 horas

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS

FOLHA COM A IDENTIFICAÇÃO DO ESO

I. ESTAGIÁRIO

NOME: Aline Raaby Ferreira Claudino

MATRÍCULA Nº 10154052400

CURSO: Medicina Veterinária

PERÍODO LETIVO: 2017.2

ENDEREÇO PARA CONTATO: Rua São Miguel, nº. 614, Boa Vista, Garanhuns/PE.

FONE: (87) 9-9953-1551

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

SUPERVISOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

FORMAÇÃO: Medicina Veterinária

II. EMPRESA/INSTITUIÇÃO

NOME: Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns

ENDEREÇO: Avenida Bom Pastor, s/n - Boa Vista.

CIDADE: Garanhuns

ESTADO: Pernambuco

CEP: 55292-270

FONE: (87) 3764-5505

III. FREQUÊNCIA

INÍCIO E TÉRMINO DO ESTÁGIO: 01/11/2017 a 15/12/2017

TOTAL DE HORAS ESTAGIADAS: 248 horas

À Deus, por mais uma etapa vencida na minha vida.

Aos meus pais, Vera Lucia Ferreira de Lima e Damião José de Andrade.

Ao meu amado, Paulo César Alves dos Santos.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ter proporcionado a sapiência necessária para que eu pudesse realizar todos as minhas pretensões acadêmicas e ter meu porto seguro durante essa jornada.

Aos meus pais, sobretudo a minha mãe, Vera Lucia Ferreira de Lima, que sempre me apoiou e agiu como agente facilitadora, orando por mim, sempre demonstrando sua bondade e amor perene.

Às minhas amigas de caminhada acadêmica: Islanne Barbosa, Naiany de Amorim e Edjane Oliveira. Sem vocês, a caminhada teria sido mais difícil.

Às meninas da Microbiologia de Alimentos, Ana, Lorena, Kallyane e Nataly que me auxiliaram em todos os meus trabalhos.

Aos meus amigos, em especial Alejandro Trujillo, Carlos Alberto, Jadiel Siqueira e Laryssa Marques, pois em vocês encontrei verdadeiros irmãos. Obrigada pela paciência, pelo sorriso, pelo abraço, pela mão que sempre se estendia quando eu precisava. Esta caminhada não seria a mesma sem vocês. Sou grata a Deus por suas vidas.

Ao meu amado, Paulo César Alves dos Santos, por todo apoio, paciência, amor e companheirismo dedicados. Te amo!

A todos os meus professores pela contribuição na minha vida acadêmica e por tanta influência na minha futura vida profissional.

Ao meu orientador, Marcelo Mendonça, por todos seus ensinamentos, paciência, incentivos e por toda confiança provida a mim. Muito obrigada.

Obrigada a todos que, mesmo não citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa, para sempre obrigada.

**“QUE TODO O MEU SER LOUVE AO SENHOR, E QUE EU NÃO
ESQUEÇA NENHUMA DAS SUAS BÊNÇÃOS!” SALMOS 103:2.**

RESUMO

O queijo de coalho é muito produzido e consumido na região Nordeste do Brasil. Apesar da produção e comercialização deste produto estar regulamentada por normativas estaduais e federais, a fabricação e venda informais são bastante comuns. Dentre os microorganismos patogênicos, *Salmonella* spp. é um dos principais agentes de doenças transmitidas por alimentos, devendo estar ausente em produtos de origem animal. O objetivo do presente trabalho foi realizar a detecção de *Salmonella* spp. em queijos de coalho, provenientes de feiras livres de Garanhuns - PE. Foram avaliadas 12 amostras de queijo de coalho, comercializadas em feiras livres de diferentes bairros da cidade. A detecção de *Salmonella* spp. foi realizada utilizando-se o método convencional de isolamento e o teste rápido imunocromatográfico *Singlepath Salmonella* (Merck-Millipore). Inicialmente, 25g de cada amostra foram adicionadas em 225mL de Água Peptonada Tamponada (APT), e incubadas por 24h a 37°C. Em seguida, 0,1mL do caldo APT foi adicionado em 10mL do caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e, então, incubado por aproximadamente 18h a 42°C. Ao final deste período, os caldos RV que demonstraram turbidez foram utilizados para realizar o teste rápido. Em paralelo, as amostras do caldo RV foram semeadas em placas de ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Hektoen Entérico (HE), sendo as colônias características submetidas aos testes bioquímicos de Tríplice Açúcar Ferro (TSI), Lisina Ferro (LIA) e Urease. Ao final, os isolados foram submetidos ao teste de sorologia para confirmação. A presença de *Salmonella* spp. foi comprovada em 66,7% (8/12) das amostras de queijo de coalho analisadas utilizando a análise convencional; já de acordo com o teste rápido, 83,33% (10/12) das amostras foram positivas para *Salmonella*. A alta ocorrência de *Salmonella* spp. em queijos comercializados nas feiras de Garanhuns, denota uma grande preocupação para saúde pública. Além disso, evidencia a falta de adoção de boas práticas de fabricação no preparo do produto, o que juntamente com as condições precárias de higiene, armazenamento e falta de refrigeração na comercialização dos mesmos, culminam no comprometimento da sua qualidade microbiológica.

Palavras-chave: Salmonelose, Queijo, Saúde pública, Infecção alimentar.

ABSTRACT

The “coalho” cheese is a handmade cheese highly produced and consumed in the northeastern region of Brazil. Although the production and selling of this product is regulated by state and federal regulations, informal manufacturing and sale are quite common. Among the pathogenic microorganisms, *Salmonella* spp. is one of the main agents of foodborne diseases and should be absent in products of animal origin. The objective of the present work was to perform the detection of *Salmonella* spp. in “coalho” cheeses from street fairs the Garanhuns – PE. Twelve samples of “coalho” cheese, marketed in open fairs in six districts of the city, were evaluated during the months of November and December 2017. The samples were transported in isothermal boxes with recyclable ice to the food microbiology laboratory of CENLAG at UAG-UFRPE. The detection of *Salmonella* spp. was performed using the standard isolation method, along with the immunochromatographic Singlepath *Salmonella* rapid test (Merck-Millipore), according to the manufacturer's recommendations. Initially, 25g of each sample was added in 225mL of Buffered Peptone Water (APT), and incubated for 24h at 37 °C. After, 0.1mL of APT broth was added in 10mL Rappaport-Vassiliadis broth (RV) and then incubated for approximately 18h at 42 °C. At the end of this period, RV broths showing turbidity were used to perform the Singlepath *Salmonella* rapid test. In parallel, RV broth samples were plated on Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) and Hektoen Enteric (HE) agar plates, the characteristic colonies being submitted to biochemical tests of Triple Iron Sugar (TSI), Iron Lysine (LIA) and Urease. Finally, the isolates colonies were submitted to the serology test for confirmation. The presence of *Salmonella* spp. was confirmed in 66.7% (8/12) of the rennet cheese samples analyzed using conventional analysis, according to the *Singlepath Salmonella* (Merck-Millipore) test 83.33% (10/12) of the samples were positive for *Salmonella* spp.. The high occurrence of *Salmonella* spp. in cheeses marketed at the Garanhuns fairs, shows a great concern for public health. As well as, it shows the lack of adoption of good manufacturing practices in the preparation of the product, which together with the precarious conditions of hygiene, storage and lack of refrigeration in the commercialization thereof, culminate in the compromise of its microbiological quality.

Key words: Salmonellosis, Cheese, Public health, Food infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Presença de <i>Escherichia coli</i> no caldo Ec Mug sob luz ultravioleta, proveniente de água de granja.....	12
Figura 2. Amostras de água após incubação em caldo presença-ausência (PA).....	13
Figura 3. Análises físico-químicas de água com uso de espectrofotômetro.....	14
Figura 4. Fluxograma geral do processo de produção do queijo de coalho.	22
Figura 5. Exposição das peças de queijo de coalho nas feiras livres de Garanhuns – PE.....	24
Figura 6. Exposição das peças de queijo de coalho comercializados nas feiras livres de Garanhuns – PE.	24
Figura 7. Venda em pedaços do queijo de coalho em feiras livres da cidade de Garanhuns-PE.	25
Figura 8. Agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DTA no Brasil de 2007 a 2017*.....	26
Figura 9. Distribuição de alimentos incriminados em surtos de DTA no Brasil durante o período de 2007 a 2017*	28
Figura 10. Fluxograma para isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> em alimentos	30
Figura 11. Localização dos principais bairros da cidade de Garanhuns-PE.....	33
Figura 12. Aplicação da amostra no dispositivo do teste rápido imunocromatográfico	36
Figura 13. Teste utilizado como controle positivo com inoculação de <i>Salmonella</i> sp.....	39
Figura 14. Testes sorológico para <i>Salmonella</i> spp.	39
Figura 15. Amostras submetidas ao teste rápido.	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. População dos principais bairros da cidade de Garanhuns-PE.	34
Quadro 2. Identificação das amostras de queijos das feiras-livres.....	34
Quadro 3. Resultado da presença de <i>Salmonella</i> spp. em amostras de queijo coalho analisadas através de teste rápido imunocromatográfico e análise convencional.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

APHA - American Public Health Association

APT - Água Peptonada Tamponada

ATCC - American Type Culture Collection

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BSI - British Standards

CaCO₃ - Carbonato de cálcio

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças

DBO - Demanda bioquímica de oxigênio

DQO - Demanda química de oxigênio

DTA - Doença Transmitida por Alimentos

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

ESO - Estágio Supervisionado Obrigatório

g - grama

HE - Ágar Hektoen Entérico

IDF - International Dairy Federation

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISO - International Organization for Standardization

LAMEN - Laboratório de Análises de Alimentos, Águas e Ambiente

LIA - Ágar Lisina Ferro

mL - mililitros

OD - Oxigênio Dissolvido

OMS - Organização Mundial da Saúde

PA - Presence-Absence

PCR - Reação em cadeia da polimerase

REMEPE - Rede Metrológica de Pernambuco

RV- Rappaport-Vassiliadis

TSI - Ágar Tríplice Açúcar Ferro

UFC - Unidade formadora de colônia

XLD - Agar Xilose Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESO E ATIVIDADES REALIZADAS	11
1 LOCAL DO ESO E CARACTERÍSTICAS	11
1.1 Laboratório de Análises de Alimentos, Águas e Ambientes (LAMEN)	11
1.1.1 Atividades desenvolvidas - Laboratório de análises de alimentos, águas e ambientes (LAMEN)	12
1.2 Laboratório de mestrado em sanidade e reprodução de ruminantes - Área de microbiologia dos alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns	14
1.2.1 Atividades desenvolvidas - Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns	14
CAPÍTULO II – PESQUISA CIENTÍFICA	16
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Queijo de coalho	19
2.1.1 <i>Processo tecnológico de produção do queijo de coalho</i>	20
2.2 <i>Salmonella</i> spp. um perigo para saúde pública	26
2.2.1 <i>O gênero Salmonella</i>	27
2.2.2 <i>Infecção por Salmonella spp.</i>	27
2.2.3 <i>Deteção de Salmonella spp. em alimentos</i>	29
2.2.3.1 Método convencional	30
2.2.3.2 Métodos rápidos	31
2.2.4 <i>Prevenção e controle</i>	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Local de estudo e obtenção das amostras	33

3.2 Detecção de <i>Salmonella</i> spp. pelos métodos convencional e imunocromatográfico	34
3.2.1 <i>Detecção de Salmonella spp. pelo método rápido imunocromatográfico</i>	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

CAPÍTULO I – DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESO E ATIVIDADES REALIZADAS

1 LOCAL DO ESO E CARACTERÍSTICAS

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado em dois locais distintos, durante o período de 02/10/2017 a 15/12/2017, o que gerou um total de 416 horas sob orientação acadêmica na UAG/UFRPE do Prof. Dr. Marcelo Mendonça.

1.1 Laboratório de Análises de Alimentos, Águas e Ambientes (LAMEN)

A primeira etapa do ESO, foi realizada no laboratório de Análises de Alimentos, Águas e Ambientes (LAMEN), localizado na cidade de Garanhuns - Pernambuco. O estágio foi realizado no período de 02/10/2017 a 31/10/2017, com carga horária total de 168 horas, sob supervisão da Bióloga Ana Maria de Arruda Travassos.

A estrutura física desse laboratório conta com sala para processamento de amostras, sala de incubação, sala de preparo de meios de culturas, sala de análises físico-químicas e ambiente de descontaminação e lavagem de vidrarias e utensílios, o mesmo é reconhecido pela Rede Metrológica de Pernambuco (REMEPE) e pelo INMETRO e possui certificado ISO 17025.

São realizadas análises microbiológicas de alimentos, água e análises físico-químicas de água. Das análises microbiológicas de alimentos as mais realizadas pelo laboratório são: Pesquisa de coliformes totais (35°C) e termotolerantes (45°C), Bactérias heterotróficas, *Staphylococcus* coagulase positiva, pesquisa de *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* (Figura 1), mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, e *Clostridium* Sulfito-Redutores. Dentre as análises físico-químicas da água que são efetuadas com mais frequência se destacam: verificação do pH, alcalinidade, hidróxidos em carbonato de cálcio (CaCO₃), alcalinidade de bicarbonatos em CaCO₃, condutividade elétrica, alcalinidade de carbonatos em CaCO₃, DBO (Demanda Biológica de Oxigênio), DQO (Demanda Química de Oxigênio) e OD - Oxigênio Dissolvido.

Figura 1. Presença de *Escherichia coli* no caldo Ec Mug sob luz ultravioleta, proveniente de água de granja¹.



Fonte: Arquivo pessoal.

1.1.1 Atividades desenvolvidas - Laboratório de análises de alimentos, águas e ambientes (LAMEN)

Recebimento e registro de amostras:

- Aferição e anotação da temperatura no caderno de registros;
- Preenchimento da ficha de identificação da amostra com dados referentes ao tipo de amostra, empresa de origem, temperatura no momento da coleta, responsável pela coleta, hora da coleta, ponto de coleta, hora da chegada da amostra, temperatura de recebimento da amostra no laboratório e análises solicitadas para amostra;
- Identificação da amostra com numeração e geração da ordem de serviço para cada amostra, com posterior liberação para os ensaios laboratoriais.

Análises microbiológicas:

Os meios de cultura utilizados para as análises são preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes, na sala específica para o preparo de meios e esterilização. O processamento das amostras para ensaios microbiológicos é realizado na sala de inoculação, onde a embalagem da amostra é higienizada com álcool 70%, e na sequência encaminhada para a cabine de fluxo laminar. No interior da cabine a embalagem é aberta com material estéril (tesoura, pinça, etc.), e após são pesados 25 gramas dessa amostra em balança analítica, dentro de recipiente estéril já contendo 225mL de água peptonada estéril e, em seguida, levadas para o vortex para serem homogeneizadas. Para amostras líquidas, são pipetados 25mL da amostra com pipetador automático de 10mL. Para as amostras de água, para a análise de presença ou ausência de Coliformes a 35°C ou a 45°C, é realizado todo o processamento inicial, porém,

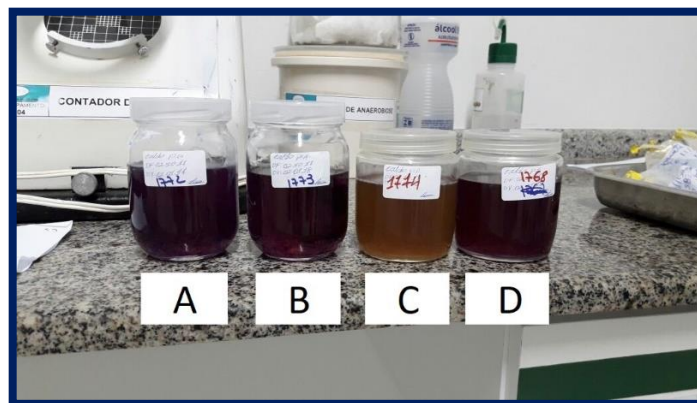
¹ Análise realizada em outubro de 2017

neste caso, o recipiente com 225mL de água peptonada é substituído por um recipiente contendo 225mL de caldo presença-ausência (PA) (Figura 2).

É importante salientar, que para a pesquisa de *Salmonella* spp., é utilizada água peptonada tamponada como diluente e caldo de enriquecimento primário. Em seguida, as amostras processadas são encaminhadas para a sala de leitura e semeio, onde são colocadas na estufa ou banho maria. Após as leituras, os resultados negativos, são em seguida descartados, e os positivos, passam para as análises subsequentes.

Na sequência, todas as amostras e materiais contaminados seguem para descontaminação. Esta área é a última área do laboratório, e possui autoclave específica apenas para descontaminação, onde todo o lixo biológico é coletado por uma empresa especializada. Após esta etapa, as vidrarias e os materiais utilizados são higienizados e desinfetados, com o uso de detergente específico e soluções cloradas.

Figura 2. Amostras de água após incubação em caldo presença-ausência (PA)²



Fonte: Arquivo pessoal.

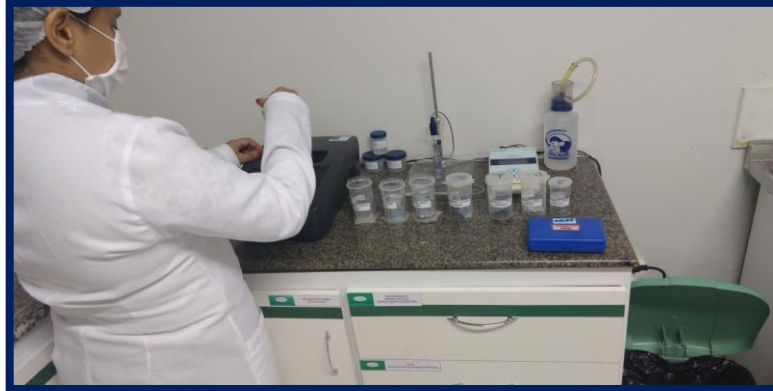
Análises físico-químicas: as amostras são submetidas ao mesmo processo de recebimento e identificação, sendo retirada uma ordem de serviço. Dentre as análises físico-químicas realizadas estão:

- alcalinidade de carbonatos em CaCO_3 ;
- alcalinidade de bicarbonatos em CaCO_3 ;
- cloretos;
- dureza total (Figura 3);
- dureza de não carbonatos;
- nitrato e nitrito;

² A amostra C apresentou resultado positivo ao teste, sendo necessária a realização de análises subsequentes, ensaio realizado em outubro de 2017.

- cálcio;
- magnésio.

Figura 3. Análises físico-químicas de água com uso de espectrofotômetro³.



Fonte: Arquivo pessoal.

1.2 Laboratório de mestrado em sanidade e reprodução de ruminantes - Área de microbiologia dos alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns

A segunda etapa do ESO foi realizada no laboratório de Microbiologia dos Alimentos, que abrange as áreas de mestrado em sanidade e reprodução de ruminantes, localizado na Universidade Federal de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns, situado na cidade de Garanhuns – Pernambuco. O estágio foi realizado no período de 01/11/2017 a 15/12/2017, com carga horária de 248 horas, sob supervisão do professor Marcelo Mendonça.

A área de Microbiologia possui estrutura para preparo de meio de cultura, incubação de micro-organismos, descontaminação de material e lavagem de vidrarias e utensílios.

1.2.1 Atividades desenvolvidas - Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns

Foi acompanhada a rotina do laboratório, em que foram efetuados diferentes experimentos. Dentre os quais, a pesquisa de *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes totais e fecais em queijos de coalho, adquiridos ou comercializados em feiras livres da cidade de Garanhuns. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas para o laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal Rural de

³ Ensaio realizado em outubro de 2017.

Pernambuco. Em seguida, a amostra foi processada e incubada para investigação destes patógenos. Os meios de cultura utilizados para as análises, foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes na sala de preparo de meios e esterilização.

CAPÍTULO II – PESQUISA CIENTÍFICA

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos possuem características composicionais que são excelentes substratos para o desenvolvimento de diversos micro-organismos causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). As DTAs, são enfermidades geradas através da ingestão de alimentos que estão contaminados com micro-organismos patogênicos ou suas toxinas, assim como com substâncias químicas ou tóxicas (NOTERMANS; VERDEGAAL, 1992; SILVA JUNIOR, 2008). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma em cada 10 pessoas adoecer no mundo por ano, devido à ocorrência de DTA (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Em 2015, no Brasil, foram notificados 575 surtos de DTA, correspondendo a 9.267 indivíduos doentes e 7 óbitos (BRASIL, 2015). Dentre as DTAs, a salmonelose é considerada pelos órgãos de saúde pública, uma das principais zoonoses que ocorre em todo o mundo, exteriorizando-se pelas suas características de endemicidade e alta mortalidade (ORDEÑEZ, 2005).

Os estudos epidemiológicos realizados em vários países, colocam *Salmonella* spp. entre o agente patogênico mais frequentemente encontrado em surtos de doenças de origem alimentar, sendo os produtos de origem láctea um dos mais importantes veículos de transmissão desta bactéria (ÁVILA; GALLO, 1996). Os principais veículos de transmissão de *Salmonella* spp. são alimentos de origem animal, principalmente aves e ovos, peixes, frutos do mar, laticínios como leite e queijos provenientes de leite não pasteurizados (SHINOHARA et al., 2008).

A maioria dos sorotipos de salmonelas são patogênicas para o homem, e os quadros clínicos podem ser divididos em três grupos: O primeiro é a febre tifóide, causada por *Salmonella* Typhi, que acomete apenas ao homem, sendo os sintomas muito graves e incluem diarreia e vômitos, septicemia e febre alta. O segundo é a febre entérica e o agente etiológico é a *Salmonella* Paratyphi A, B e C, a qual apresenta sintomas clínicos mais brandos em relação à febre tifóide, podendo o quadro evoluir para septicemia e desenvolvimento de gastroenterite, febre e vômitos. O terceiro corresponde às infecções entéricas que ocorrem em decorrência de outras salmonelas, as chamadas de salmoneloses. Neste tipo há desenvolvimento de um quadro de infecção gastrointestinal, tendo como sintomas dores abdominais, diarreia, febre baixa,

vômito, e os casos clínicos fatais são raros (TORTORA; FUNKE, 2005; SHINOHARA et al, 2008).

Dos alimentos de origem animal, o leite e seus derivados, em especial os queijos, são alimentos bastante suscetíveis ao crescimento de micro-organismos, podendo assim ocasionar surtos de infecção e intoxicação alimentar (PERRY, 2004). Dentre os queijos, o queijo de coalho é um produto de grande expressão na região Nordeste, sendo produzido amplamente de forma artesanal e industrial, com grande consumo pela população. Este representa um relevante valor socioeconômico e cultural, cujas bases encontram-se enraizadas na história do pecuarista através da transmissão cultural que ocorre de pais para filhos, mantendo a sua tradição (DANTAS et al., 2013).

Apesar da legislação federal preconizar a produção do queijo de coalho com leite pasteurizado ou tratamento térmico equivalente, em Pernambuco a legislação sobre Inspeção e Fiscalização Agropecuária permite a utilização do leite cru para fabricação do queijo de coalho, sendo este queijo geralmente produzido a partir de leite cru, em propriedades rurais pequenas, que não apresentam os devidos cuidados de higiene (NASSU et al., 2001; PERNAMBUCO, 1999). Com a utilização do leite cru, o risco de contaminação do produto aumenta por este ser altamente manipulado, e possuir ainda fatores que viabilizam a presença de micro-organismos indicadores de contaminação e bactérias potencialmente patogênicas (RUWER et al., 2011; PERNAMBUCO, 1999)

O leite pode ser contaminado por *Salmonella* spp. através de material fecal, equipamentos e utensílios contaminados, visto que este micro-organismo compõe a microbiota intestinal normal de animais de sangue quente, podendo ser eliminado pelas fezes, o que possibilita a contaminação do ambiente e conseqüentemente dos animais. Além disso, pode ocorrer contaminação através do envolvimento de manipuladores, que muitas vezes são portadores assintomáticos do micro-organismo (CONNOR; SCHWARTZ, 2005; MENEZES et al., 2014; MILLOGO et al., 2010; SILVEIRA; BERTAGNOLLI, 2014).

Com relação às técnicas de processamento, o queijo de coalho apresenta-se como um produto de intensa manipulação no decorrer de sua fabricação. Além disso, as condições higiênicas necessárias, falhas no que diz respeito às condições sanitárias de distribuição e comercialização, tornam este queijo um potente veículo de contaminantes, expondo conseqüentemente a sociedade a possíveis DTAs, ocupando assim papel importante na saúde pública (DUARTE et al., 2005). Para evitar a ocorrência de casos de DTA envolvendo produtos lácteos, é importante a utilização de matéria-prima segura e de qualidade, sendo a pasteurização uma das formas mais indicadas para eliminação de patógenos no leite cru (FUSCO; QUERO, 2014).

Devido ao conhecimento do elevado consumo do queijo de coalho principalmente na região Nordeste, de suas características de processamento e dos fatores intrínsecos que favorecem a proliferação de uma ampla variedade de micro-organismos, nesse caso constituíram-se como motivadores à realização desse estudo, que teve como objetivo a pesquisa de *Salmonella* spp. em queijos de coalho comercializados em feiras livres da cidade de Garanhuns-PE.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Queijo de coalho

O queijo é uma das formas mais antigas de alimentos da humanidade (REZENDE, 2004). A origem do nome ‘queijo de coalho’ advém do fato do mesmo ter sido tradicionalmente manufaturado com leite coagulado pela ação de coalho que era extraído do abomaso de cabritos e bezerros (AQUINO, 1983, apud ANDRADE, 2006). Este queijo é produzido há mais de 150 anos no Brasil, em vários estados da região Nordeste (CAVALCANTE, 2005). É um dos derivados lácteos mais consumidos no Nordeste, sendo bastante difundido nos demais estados do país. O que caracteriza sua grande importância econômica na região, uma vez que em muitos casos a sua venda garante a principal fonte de renda da população (ALMEIDA et al., 2010 apud SILVA et al., 2012).

Segundo Almeida, Paiva Júnior e Guerra (2013), no estado de Pernambuco, a produção de leite e derivados é um dos principais suportes econômicos nas microrregiões de Garanhuns, Vale do Ipojuca e Vale do Ipanema, além disso possui uma importância relativa na Zona da Mata, Sertão do São Francisco, Sertão do Araripe e Sertão do Pajeú. Estes fatos demonstram a relevância econômica e social da produção de queijo para o estado, principalmente no que diz respeito aos pequenos produtores do Agreste e Sertão, sendo o queijo de coalho uma representação genuína da tradição e cultura do estado de Pernambucano.

De acordo com a Instrução normativa N° 30, de 26 de julho de 2001, que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do queijo de coalho, este produto é definido como um queijo obtido através da coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas, podendo ser complementado por ação de bactérias selecionadas. Sua consistência é semidura ou elástica, a textura pode ser compacta ou macia e a cor é branca amarelada uniforme, podendo ainda apresentar pequenas olhaduras (BRASIL, 2001a).

A legislação sobre Inspeção e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco (1999), classifica o queijo artesanal como tipo A ou B, sendo o queijo tipo B produzido a partir do leite cru, integral ou desnatado, massa crua prensada ou não, e o tipo A produzido com leite pasteurizado, integral ou desnatado, massa crua prensada.

Possui como ingredientes obrigatórios o leite integral ou padronizado, coalho ou outras enzimas, tendo como ingredientes opcionais cloreto de cálcio, cultivo de bactérias lácteas, sólidos de origem láctea, condimentos, especiarias e cloreto de sódio. Sua classificação com relação ao teor de gordura varia de semigordo à gordo, e com relação ao teor de umidade é um queijo de médio a alto teor. Para comercialização e conservação, o mesmo não deve apresentar

temperatura superior a 12°C, nem deve possuir contaminantes orgânicos em quantidades superiores aos limites estabelecidos, tampouco impurezas e substâncias microscópicas estranhas de qualquer natureza (BRASIL, 2001a). A RDC nº 12 da ANVISA define o padrão microbiológico do queijo de coalho exigindo a ausência de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* neste alimento (BRASIL, 2001b).

2.1.1 Processo tecnológico de produção do queijo de coalho

De acordo com a Portaria N° 146 de 7 de Março de 1996, que estabelece o regulamento técnico de identidade e qualidade dos queijos, o queijo é definido como o produto fresco ou maturado obtido através da separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

O queijo de coalho possui características distintivas em seu processo de elaboração, de acordo com a instrução normativa N° 30 de 26 de Julho de 2001, a sua coagulação dura em torno de 40 minutos, é feito o corte e mexedura da massa, remoção parcial do soro, aquecimento da massa com água quente ou vapor indireto até obtenção de massa semicozida até 45°C ou cozida entre 45° e 55°C, adição de sal à massa, prensagem, secagem, embalagem e estocagem em temperatura média de 10 – 12°C, normalmente até 10 dez dias. Esse queijo poderá ser também elaborado a partir de massa crua. Deve ser acondicionado em embalagem bromatologicamente apta, com ou sem vácuo e conservado e comercializado em temperatura não superior a 12°C (BRASIL, 2001a).

Segundo TEXEIRA (1996) a fabricação do queijo de coalho deve seguir as seguintes etapas:

I. Seleção da matéria-prima: leite integral de boa qualidade;

II. Pasteurização: aquecimento à temperatura de 65°C, por 30 minutos, ou a 72°C, por 15 segundos, seguida de resfriamento em água corrente até 38°C ou 40°C;

III. Adição de Ingredientes: Cloreto de Cálcio (20 gramas em 100 litros de leite), fermento láctico (1 litro para 100 litros de leite), coalho líquido (puro ou diluído em água, 70mL a 100mL em 100 litros de leite);

IV. Coagulação do Leite: o leite coagulará, em 40 minutos;

V. Corte da Coalhada: é realizado com um equipamento denominado de lira, no sentido horizontal e vertical, de forma que o grão de massa fique entre 1,2 e 1,5 cm;

VI. Repouso da Massa: após o corte, a massa deve ficar em repouso por três a cinco minutos;

VII. Mexedura da massa: É feita a primeira e segunda mexedura com agitação lenta e contínua na massa, com agitador de aço inoxidável por 20 minutos;

VIII. Cozimento da Massa: Esta etapa consiste em mexer continuamente a massa até que atinja entre 45°C e 55°C.

IX. Verificação do ponto da massa: o ponto está ideal quando os grãos prensados nas mãos formam um bloco único.

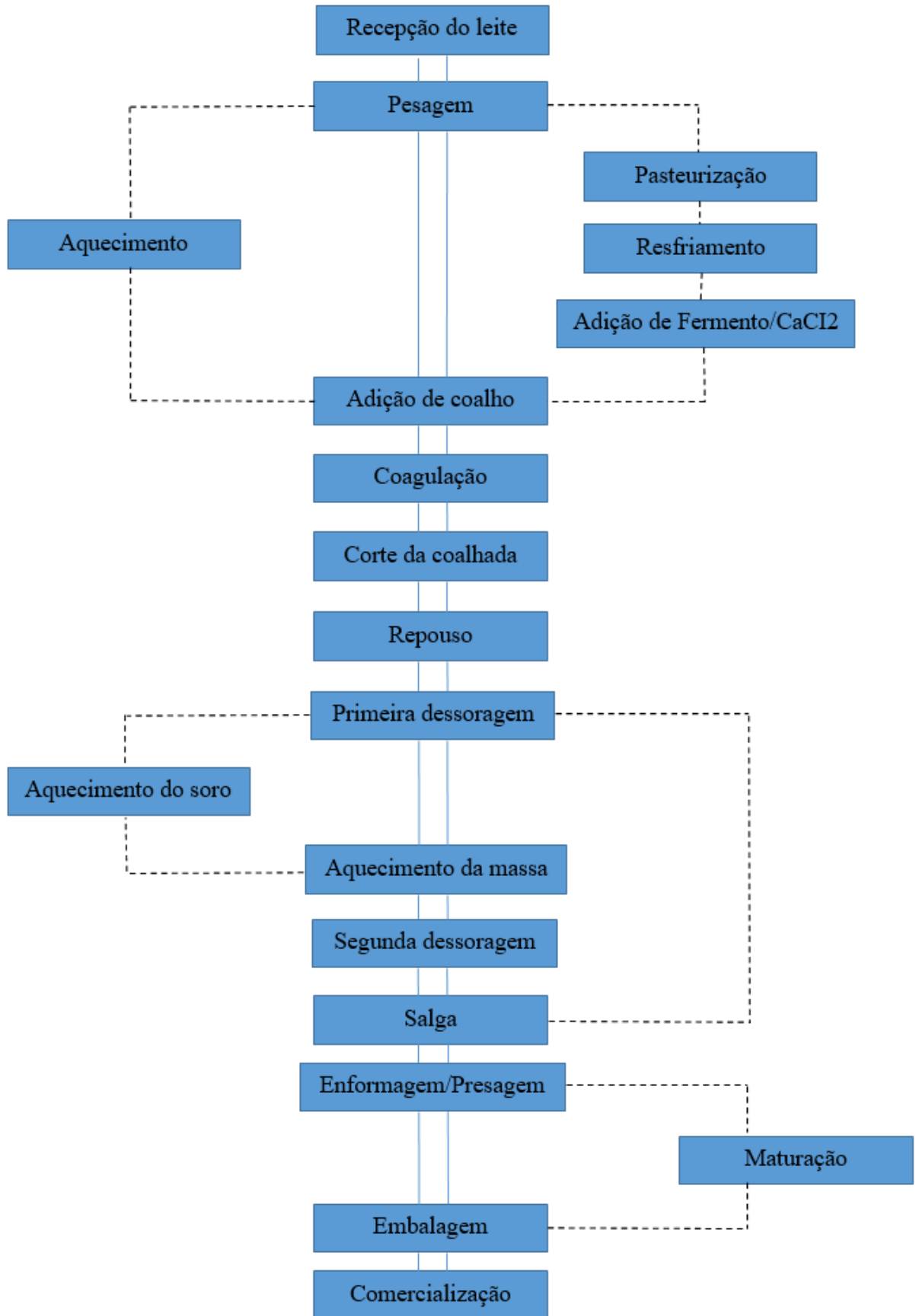
X. Retirada do Soro e Coleta da Massa: deve-se retirar cerca de 90% do soro, adicionar o sal à massa na proporção de 600 a 700 gramas, para cada 100 litros de leite utilizados;

XI. Prensagem dos Queijos: os queijos devem ser transportados para prensas coletivas verticais ou individuais e prensados por 30 minutos, com 8 a 10 vezes o peso do queijo. Em seguida virar os queijos dentro das próprias formas e prensar com igual peso por três a quatro horas.

XII. Embalagem: feita em sacos plásticos, do tipo Cray-o-vac.

Segundo PERRY (2004), metodologias de produção do queijo de coalho diferem de uma queijaria para outra, porém, o processo básico de fabricação dos queijos é comum a quase todos, conforme ilustrado na figura 4.

Figura 4. Fluxograma geral do processo de produção do queijo de coalho.



Fonte: Adaptado de DANTAS, 2012.

2.1.2 Local de comercialização dos produtos: Feiras livres

A palavra feira deriva do latim *feria*, significa dia de festa, é utilizada para designar o local escolhido para efetivação de transações de mercado em dias fixos e horários determinados. Possui um formato tradicional de varejo, que não conta com lojas físicas ocorrendo em instalações provisórias montadas nas vias públicas em pontos estratégicos da cidade (COLLA et al., 2007; COÊLHO; PINHEIRO, 2009). As feiras constituem uma modalidade de mercado varejista ao ar livre realizadas com periodicidade semanal e organizadas como serviço de utilidade pública, voltado à distribuição local de gêneros alimentícios e outros produtos básicos (ALMEIDA, 2011).

A feira livre é considerada um dos locais mais populares de comercialização de alimentos a varejo, com circulação dentro das áreas urbanas. Contudo essa comercialização é motivo de preocupação constante, devido as suas deficiências higiênico-sanitárias (GARCIA et al., 2000).

Segundo Amorim et al. (2014), os queijos informais não passam por controle de qualidade, além disso, não são inspecionados e geralmente são comercializados nas feiras sem os cuidados necessários na produção e conservação (figuras 5 e 6). O que implica uma série de problemas na sua qualidade, levando a altos níveis de contaminação por micro-organismos, justificada pela manipulação excessiva, falta de boas práticas e alto teor de umidade do produto, o que favorece o desenvolvimento de micro-organismos.

Além disso, nas feiras livres, os alimentos ficam expostos sob condições deletérias, sendo submetidos às ações diretas dos micro-organismos provenientes da contaminação do ambiente, devido a embalagem e acondicionamento inadequados (GERMANO; GERMANO, 2001).

Outro problema, é que na comercialização de queijos, comumente os produtos são vendidos em pedaços (figura 7), havendo o perigo de incorporação de matérias estranhas de origem biológica ou terra no produto, devido a falhas e excesso de manipulação durante a venda a retalho, higienização precária das bancas e dos utensílios utilizados pelos feirantes e também por contaminação cruzada entre os produtos expostos (RONCADA; CORREIA, 1997).

Figura 5. Exposição das peças de queijo de coalho nas feiras livres de Garanhuns – PE.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 6. Exposição das peças de queijo de coalho comercializados nas feiras livres de Garanhuns – PE.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Figura 7. Venda em pedaços do queijo de coalho em feiras livres da cidade de Garanhuns-PE.



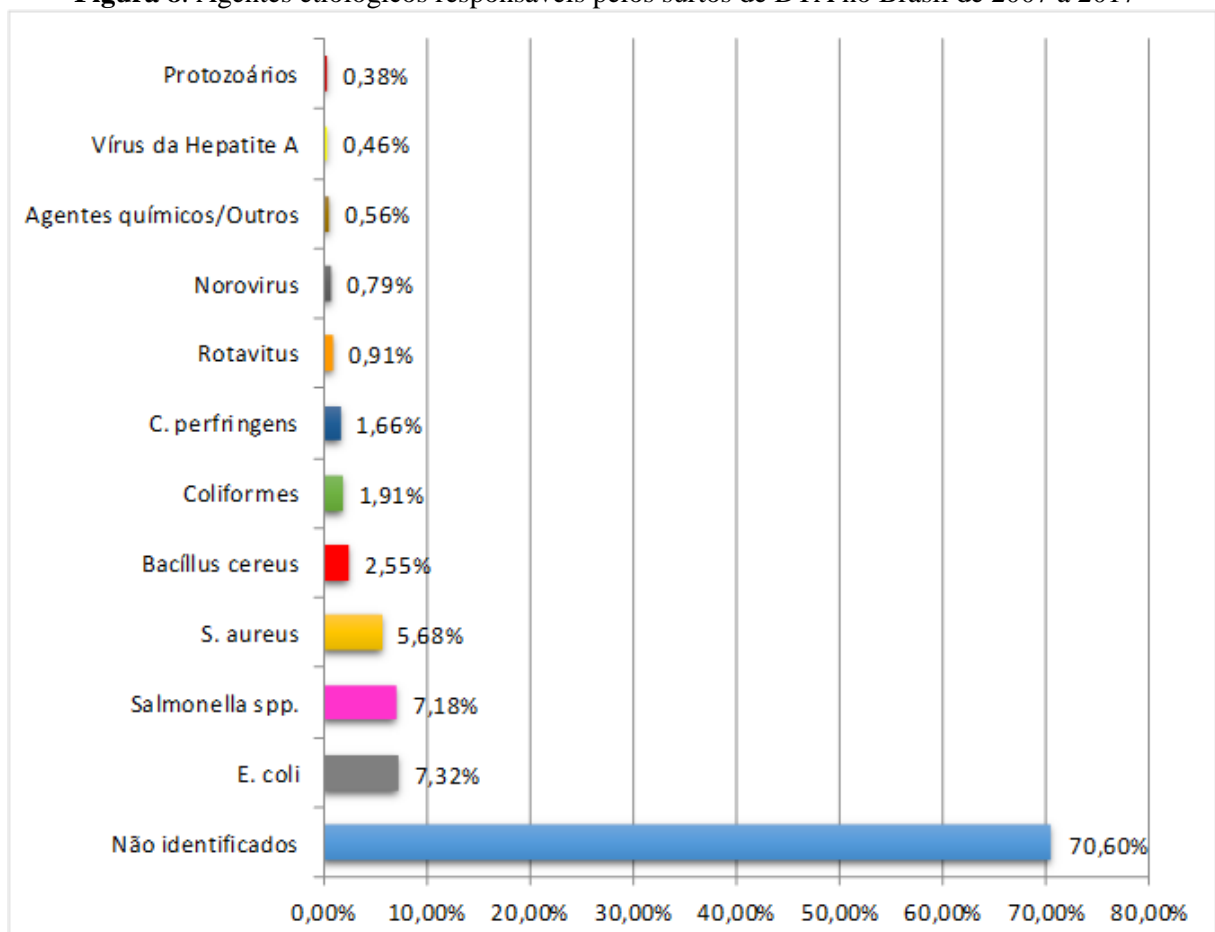
Fonte: Arquivo Pessoal.

2.2 *Salmonella* spp. um perigo para saúde pública

Os micro-organismos do gênero *Salmonella* spp. são considerados um dos principais patógenos envolvidos em surtos de origem alimentar no mundo (GERMANO; GERMANO, 2008). No Brasil, dados do Ministério da Saúde, colocam esse micro-organismo como um dos principais causadores de DTAs nos anos de 2007 a 2017 (figura 8) (BRASIL, 2017). É imprescindível destacar que a subnotificação dos surtos de origem alimentar nos serviços de vigilância epidemiológica, é uma realidade mundial. (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, 2002).

Em função dos riscos que esse importante patógeno representa para a saúde dos consumidores, é de vital importância que se apreenda maior e melhor conhecimento, bem como se desenvolvam técnicas mais eficazes para detecta-los.

Figura 8. Agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DTA no Brasil de 2007 a 2017*



*2016 e 2017: Dados sujeitos a atualização.

Fonte: Adaptado de BRASIL 2017.

2.2.1 O gênero *Salmonella*

Bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família Enterobacteriaceae, são bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e podem crescer em uma ampla faixa de temperatura de 7 a 48°C (ADAMS, 2008).

Estes micro-organismos possuem vasta distribuição mundial, estando presente nos ambientes de produção animal, o que representa um grande problema sanitário. O gênero é dividido em três espécies: *Salmonella enterica*, *S. bongori* e *S. subterranea*. A espécie *S. enterica* possui seis subespécies: *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*, *salamae* e *enterica e*, aproximadamente, 2.500 sorotipos, porém somente 60 são de importância médica humana ou animal, sendo que os sorovares de importância na saúde pública pertencem à *S. enterica* sub. *enterica* (SHELOBOLINA et al., 2004; GAST, 2008). Estes micro-organismos possuem temperatura ideal em torno de 37°C e pH de aproximadamente 7,0 (LEVINSON, 2005).

A sua sorotipificação é fundamentada no documento designado Kauffmann-White Scheme, consistindo na caracterização realizada por testes de aglutinação em que são aplicados os antígenos somáticos (O) e flagelares (H), assim como em padrões de fermentação de açúcares e susceptibilidade a bacteriófagos. *Salmonella enterica*, subespécie *enterica*, sorotipo Typhimurium e Enteritidis são os sorotipos predominantes em salmonelose humana (SHINOHARA, 2008). Estes micro-organismos são sensíveis ao calor, portanto a pasteurização e tratamentos térmicos semelhantes são capazes de eliminá-los dos alimentos (FERNANDES, 2009).

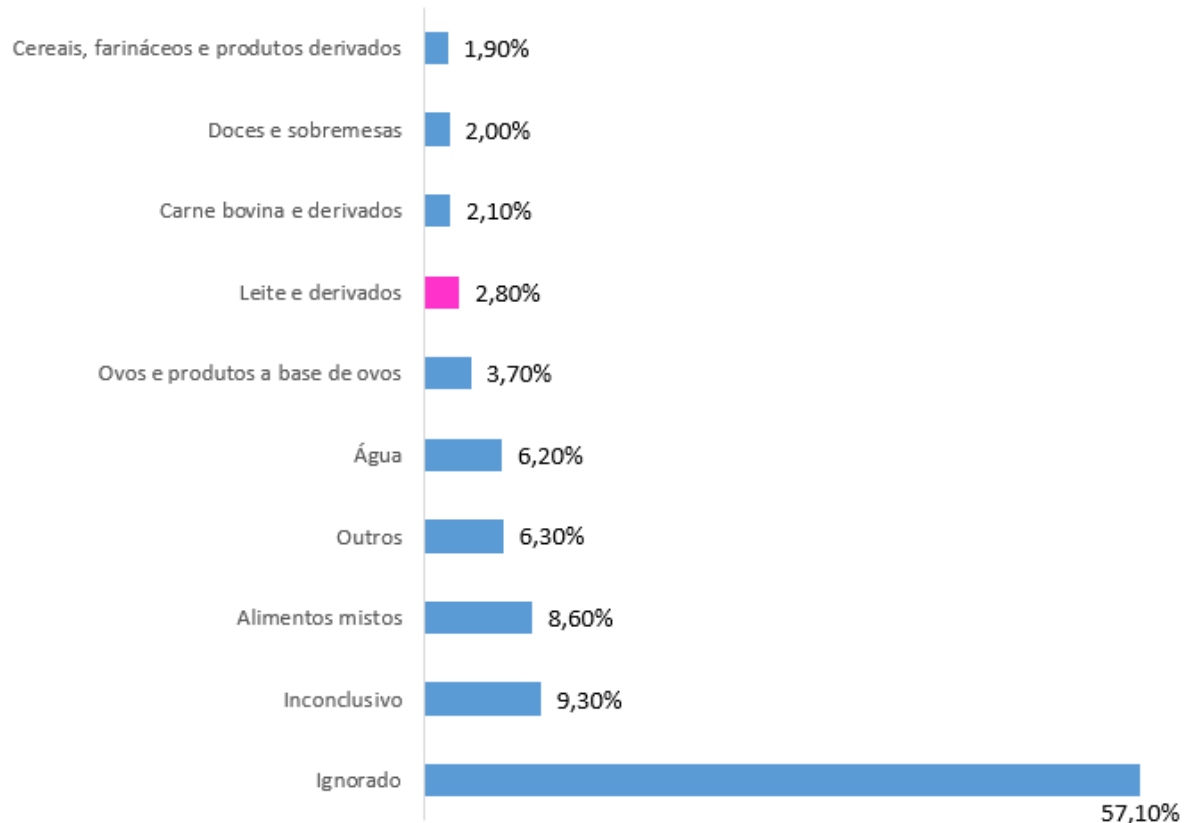
2.2.2 Infecção por *Salmonella* spp.

Calcula-se em todo o mundo que a quantidade de gastroenterites causadas por *Salmonella* spp. é superior a 93,8 milhões de casos, resultando em torno de 155.000 mortes por ano (HENDRIKSEN et al., 2011; TSOLIS et al., 2011). A dose infectante para a ocorrência da doença varia de 10^6 a 10^8 UFC/g, entretanto o desencadeamento da salmonelose depende do grau de resistência do hospedeiro, da virulência e estado fisiológico da cepa e da matriz alimentar carreadora (HUMPRHEY, 1991).

Os principais veículos de transmissão são alimentos de origem animal, como aves, ovos, carnes, peixes, frutos do mar, laticínios como leite e queijos oriundos de leite não pasteurizados e sorvetes (SHINOHARA et al., 2008). Dentre estes alimentos, os lácteos se destacam, sendo que, segundo o Ministério da Saúde, o leite e seus derivados foram associados

como veículos de transmissão de 2,8% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos que ocorreram no Brasil no período de 2007 a 2017 (figura 9) (BRASIL, 2017).

Figura 9. Distribuição de alimentos incriminados em surtos de DTA no Brasil durante o período de 2007 a 2017*.



*2016 e 2017: Dados sujeitos a atualização.

Fonte: Adaptado de BRASIL 2017.

Em humanos, a infecção apresenta-se de três formas diferentes, que diferenciam-se de acordo com sorovar envolvido. Os sorovares adaptados são o *S. Typhi* que causa a febre tifóide, o *S. Paratyphi* causador da febre entérica e os sorovares não adaptados que são responsáveis pelas gastroenterites (PAIM, 2016).

A forma de disseminação do sorovar *S. Typhi* é interpessoal, por intermédio da água e alimentos contaminados com material fecal humano. Entre os sintomas estão a febre alta, diarreia e vômitos, podendo causar até septicemias (BRASIL, 2005). Na febre entérica, causada pela *S. Paratyphi*, a infecção está relacionada com o consumo de alimentos crus, como leite, vegetais e ovos, os sintomas clínicos são mais brandos podendo também evoluir para um quadro de septicemia, o seu período de incubação varia de 6 a 48 horas e a duração média da doença é de aproximadamente três semanas. É importante ressaltar que após a infecção, o indivíduo torna-se portador por meses ou anos representando então uma fonte constante de infecção (SHINOHARA et al., 2008).

A gastroenterite causada pelos sorovares não adaptados não é caracterizada pela ocorrência de curso rápido, tendo manifestação dos primeiros sintomas entre 12 e 36 horas após a ingestão do alimento contaminado, principalmente ovos e produtos cárneos. A diarreia, náuseas e dor abdominal são os sintomas mais comuns desta manifestação (FORSYTHE, 2013). A maior parte dos casos de gastroenterites são auto limitantes, não sendo necessário o tratamento com terapias antimicrobianas (MOREIRA, 2012).

2.2.3 Detecção de *Salmonella* spp. em alimentos

Existe uma busca constante pelos pesquisadores da área de alimentos por uma metodologia adequada e eficiente para detectar micro-organismos em alimentos (GIOMBELLI, 2000). A identificação de *Salmonella* spp. em alimentos pode levar em torno 4 a 7 dias quando o ensaio é realizado de acordo com a metodologia tradicional ISO 6579, sendo necessários 3 a 4 dias para obtenção de resultado negativo confirmatório neste método (BENNETT et al., 1998).

Os procedimentos padrões para isolamento de *Salmonella* spp. são especificados por organismos internacionais, como ISO (International Standards Organization), APHA (American Public Health Association), AOAC (Association of Official Analytical Chemists), IDF (International Dairy Federation), BSI (British Standards). Porém, não existe uma única metodologia que possa ser aplicada para todos os tipos de alimentos (TIEJEN; FUNG, 1995).

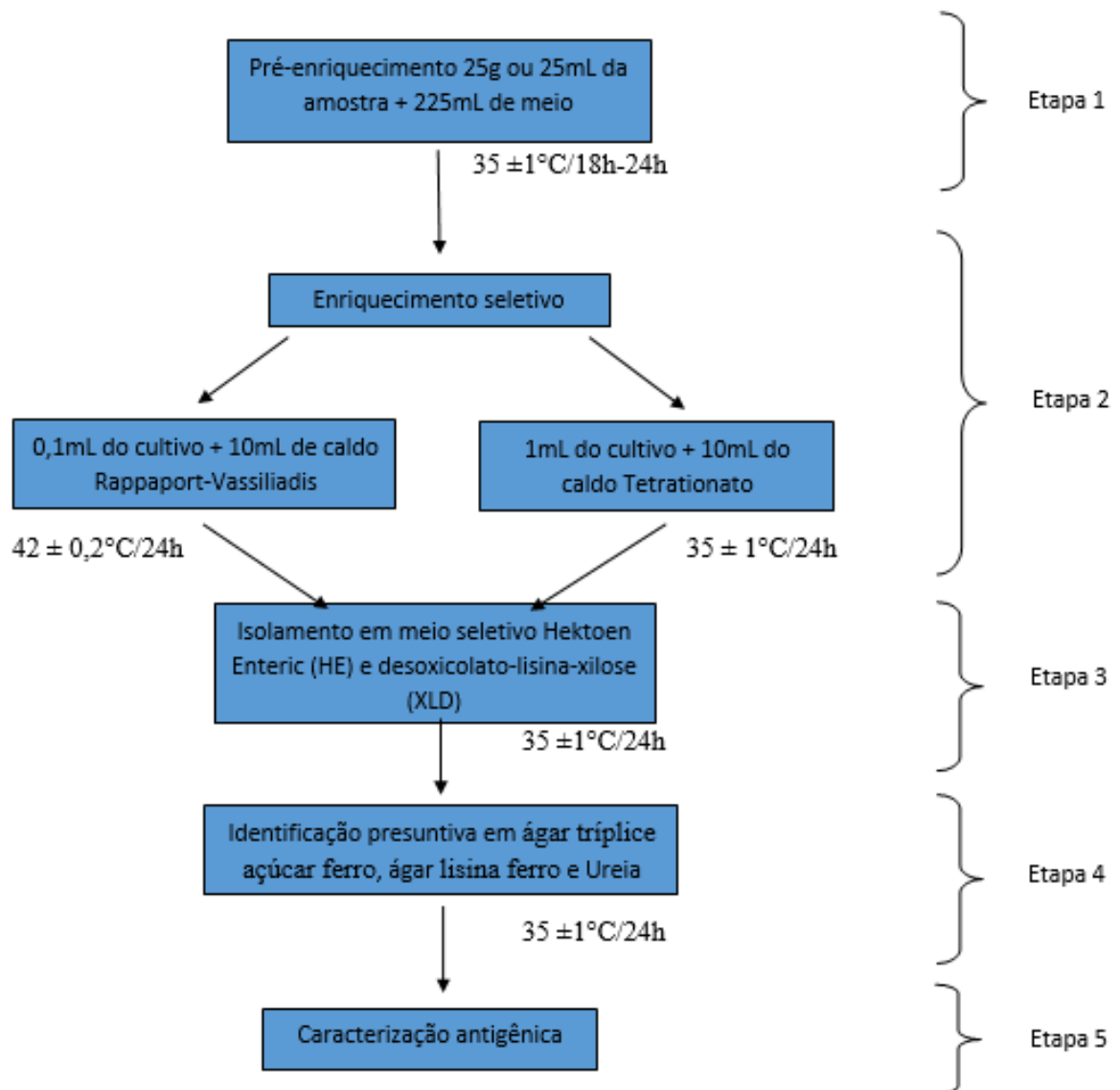
Para a escolha do melhor método de análise é necessário considerar quais os objetivos da mesma, pois esses determinam o tipo de análise (um indicador), método (rapidez, precisão, repetibilidade e reprodutibilidade), a alíquota analisada (produto final ou da linha de produção), a interpretação do resultado, as ações a adaptar e os ajustes do processo (FRANCO, 1999; ICMSF, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2004).

Para a detecção deste agente através do método convencional de análise, é necessário um longo tempo para obtenção de resultados e um grande número de etapas, sendo estes os principais motivos para o desenvolvimento de novas técnicas para pesquisa de *Salmonella* spp. em alimentos, que tem como objetivos principais a redução do tempo de análise, e a simplificação do trabalho laboratorial, além da redução do custo da análise (BLACKBURN, 1993).

2.2.3.1 Método convencional

O método tradicional de detecção de *Salmonella* spp. em alimentos envolve basicamente cinco etapas: 1) o pré-enriquecimento em caldo não seletivo para restaurar células injuriadas a uma condição fisiológica estável; 2) enriquecimento seletivo, no qual a amostra é novamente colocada em caldo de cultivo, contendo reagentes inibitórios que permite a multiplicação de *Salmonella* spp, enquanto restringe a proliferação da maioria das outras bactérias; 3) semeadura em meios sólidos seletivos que restringem a multiplicação de outras bactérias que não *Salmonella* ; 4) testes bioquímicos, que fornecem dados fenotípicos da cultura isolada; 5) sorotipagem para caracterização antigênica, que é o passo definitivo e provê a identificação específica da cultura isolada (figura 10) (BAILEY et al., 1991).

Figura 10. Fluxograma para isolamento e identificação de *Salmonella* em alimentos.



A etapa 4, observada na figura 10, refere-se à primeira parte de confirmação do teste, nomeado de teste de triagem, que tem como objetivo verificar se as colônias típicas que cresceram na etapa 3 são de fato *Salmonella*. Nesta triagem, as colônias são submetidas aos testes de descarboxilação da lisina, fermentação da lactose e/ou sacarose e produção de sulfeto de hidrogênio, em agar lisina ferro (LIA) e agar tríplice açúcar ferro (TSI), permitindo excluir das etapas subsequentes colônias que não são típicas de salmonela (SILVA, JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997; AOAC, 2002; FORTUNA; FRANCO, 2005).

Já a etapa 5, refere-se a segunda parte de confirmação do teste, que é realizado através de provas sorológicas em que as colônias características que se desenvolveram na etapa 3 e continuam sendo caracterizadas como colônias típicas após a etapa 4, serão submetidas ao teste sorológico somático polivalente para a confirmação do diagnóstico (FORTUNA; FRANCO, 2005).

2.2.3.2 Métodos rápidos

Nos últimos anos, houve um aumento no desenvolvimento de métodos de análise de alimentos, mais rápidos e muitas vezes mais sensíveis do que os métodos tradicionais (VON BLANKENFELD-ENKVIST; BRANNBACK, 2002). Dentre estes, os métodos imunológicos e moleculares têm recebido uma atenção muito grande por parte de pesquisadores e da indústria.

As técnicas imunológicas se destacam entre os métodos rápidos, pois contam com a especificidade da ligação do anticorpo com o antígeno. Os testes imunológicos se baseiam nas reações antígeno-anticorpo, os quais geralmente utilizam anticorpos marcados com uma enzima cromogênica, sendo a leitura dos resultados facilitada por equipamentos leitores (BEUMER, et al., 1991; FRANCO, 1999; REIS, et al., 2001; ALCOCER; OLIVEIRA, 2003).

O método imunocromatográfico se baseia em interações antígeno-anticorpo. É formado por um dispositivo plástico que contém duas ou três câmaras que se intercomunicam. As câmaras possuem em seu interior um material absorvente revestido por anticorpos específicos ligados a partículas do látex na câmara controle. Coloca-se uma alíquota da amostra na câmara de inoculação e caso o micro-organismo alvo esteja presente, acontecerá uma ligação anticorpo-látex com migração do complexo através do material absorvente. Já na câmara teste, o complexo antígeno-látex-anticorpo será capturado por anticorpos específicos ao complexo, o que resultará numa banda visível de precipitação. Na câmara controle, o excesso de migração forma outra linha de precipitação que assegura que o material passou por todas as câmaras do kit. Este teste é simples e rápido, e um exemplo deste teste imunocromatográfico é o Singlepath

Salmonella (FUNG, 1994; PATEL, 1994; GIESE, 1995; GRIFFITHS, 1995; OLSON, 1996; FRANCO; LANDGRAF, 2004; FENG, 2007)

Quando se compara os métodos imunológicos aos métodos tradicionais, o tempo de ensaio é reduzido em até dois dias, o teste é mais sensível e específico, contudo a análise estatística demonstra que não há diferença entre os métodos (BEUMER, et al., 1991; FRANCO, 1999; AOAC, 2002).

Tapchaisri apud Dickel et al (2005), realizou detecção de *Salmonella* pelo método convencional, PCR e ELISA, para avaliar a sensibilidade, especificidade, eficácia e valores preditivos chegando à conclusão de que o teste ELISA é o mais simples, sensível, específico e mais barato.

2.2.4 Prevenção e controle

Para prevenção e controle das salmoneloses é necessário evitar riscos de contaminação cruzada, assegurar um aquecimento suficiente dos alimentos, comprovar que os manipuladores de alimentos estão em bom estado de saúde, promover um adequado controle de pragas e roedores em áreas de manipulação e venda de alimentos, e incrementar a vigilância e detecção de *Salmonellas* sobre todos os alimentos cozidos (HAYES, 1993 *apud* FORTUNA; FRANCO, 2005).

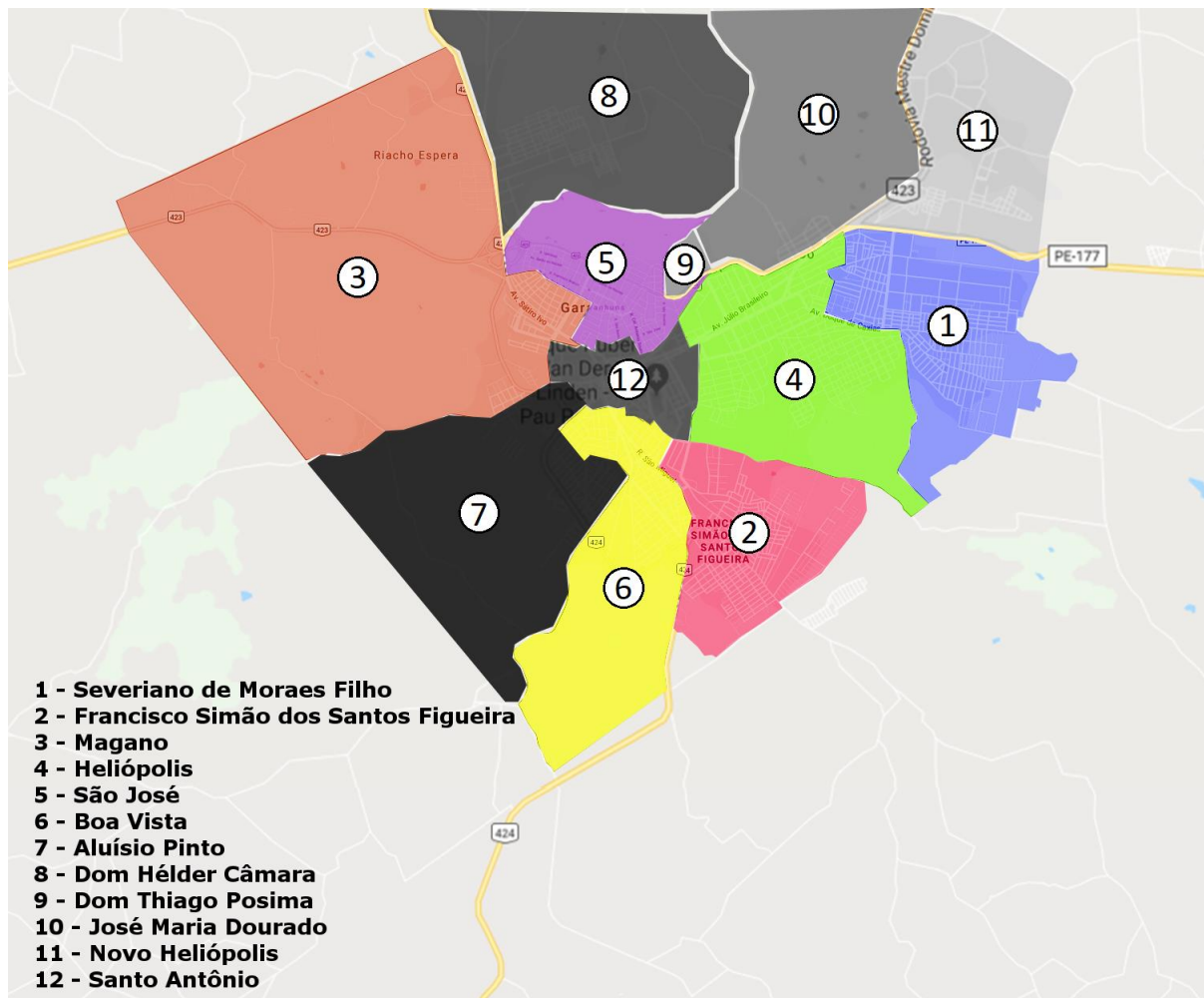
De acordo com Ordóñez Pereda e Cambero Rodríguez (2005), as medidas de prevenção de *Salmonella* spp. são simples, o problema é que existe uma dificuldade de adoção das mesmas, como por exemplo, a correta lavagem das mãos de manipuladores de alimentos, cuidados desde a recepção da matéria-prima até o preparo e consumo do alimento, higienização adequada dos utensílios e dos equipamentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de estudo e obtenção das amostras

Foram avaliadas 12 amostras de queijo de coalho, comercializadas em feiras livres de seis bairros da cidade de Garanhuns, localizada em Pernambuco, sendo que os bairros foram nomeados de 1+ a 6 (figura 11 e quadro 1). A cidade possui uma população estimada pelo censo 2010 de 138.642 pessoas. (BRASIL, 2010). Em cada feira foram coletadas duas amostras durante os meses de novembro e dezembro de 2017. As amostras coletadas foram transportadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável até o laboratório de sanidade e reprodução de ruminantes da UAG-UFRPE, onde foram registradas (quadro 2) e analisadas.

Figura 11. Localização dos principais bairros da cidade de Garanhuns-PE.



Fonte: Adaptado de Google Maps, visualizado em dezembro de 2017.

Quadro 1. População dos principais bairros da cidade de Garanhuns-PE.

Bairro	População	Jovens*	Idosos*
Boa Vista	10.722	2.345	968
Francisco Simão dos Santos Figueira	11.270	3.233	595
Heliópolis	19.409	4.773	1.718
Magano	12.148	3.363	796
São José	11.636	2.801	908
Severiano de Moraes Filho	19.971	5.434	1.442

*Dados coletados por jovens com a faixa etária de 0 a 14 anos e por idosos com mais de 65 anos.

Fonte: IBGE: <https://censo2010.ibge.gov.br/sinopseporsetores/?nivel=st>.

Quadro 2. Identificação das amostras de queijos das feiras-livres.

Amostra	Bairro onde foi coletada
Q1.1	Severiano de Moraes Filho
Q1.2	Severiano de Moraes Filho
Q2.1	Francisco Simão dos Santos Figueira
Q2.2	Francisco Simão dos Santos Figueira
Q3.1	Magano
Q3.2	Magano
Q4.1	Heliópolis
Q4.2	Heliópolis
Q5.1	São José
Q5.2	São José
Q6.1	Boa Vista
Q6.2	Boa Vista

3.2 Detecção de *Salmonella* spp. pelos métodos convencional e imunocromatográfico

O isolamento e confirmação de *Salmonella* spp. nas amostras de queijo de coalho, foram realizados através de duas metodologias, convencional e imunocromatográfico. O método analítico convencional foi baseado na metodologia definida pela Instrução Normativa nº 62/2003 (BRASIL, 2003) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Para o método imunocromatográfico, utilizou-se o kit de diagnóstico rápido Singlepath *Salmonella* (Merck-Millipore), com o intuito de se avaliar a eficácia e obter o resultado mais rapidamente.

3.2.1 Isolamento de *Salmonella* spp. pelo método convencional

Para isolamento convencional de *Salmonella* spp., foi utilizada a metodologia, a qual é dividida em quatro etapas.

Etapa I - consistiu em enriquecimento em caldo não seletivo para recuperação das células, 25g de cada amostra de queijo de coalho foram adicionadas em 225mL de Água Peptonada Tamponada (APT), e incubadas por 24h a 37°C.

Etapa II - nesta fase foi realizado o enriquecimento seletivo em que estimulou-se a multiplicação de salmonelas com redução ou inibição de outros micro-organismos. Uma alíquota de 0,1mL do caldo APT foi adicionado em 10mL do caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e incubado por aproximadamente 18h a 42°C. Ao final deste período, os caldos RV que demonstraram turbidez foram utilizados para semeadura por estrias em placas de Ágar Desoxicolato-Lisina-Xilose (XLD) e Ágar Hektoen Entérico (HE), as quais foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Etapa III - nesta etapa foi realizada a confirmação bioquímica das colônias típicas, em que com o auxílio de uma agulha de inoculação foi selecionada uma colônia típica, a qual foi semeada em tubos inclinados de Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), Ágar Lisina Ferro (LIA) e Uréia, realizada a semeadura em picadas na rampa, os tubos foram incubados por 24h a 35°C.

Etapa IV - foi realizada a confirmação sorológica através de anti-soro somático O (termoestável) e anti-soro flagelar H (termolábel), geralmente associado à motilidade, da empresa Probac, esta análise foi realizada de acordo com a ISO 6579:2002 (International Standartization Organization).

Foi colocado uma gota de cada anti-soro em uma placa de vidro e com o auxílio de uma alça de platina, selecionou-se uma colônia do ágar XLD. Esta colônia que estava na alça, foi homogeneizada com os anti-soros O e H, após o qual foi observada uma reação antígeno-anticorpo. Nos casos em que a reação foi positiva, houve a formação de grumos, denominada aglutinação, esta reação homóloga é rápida e de alta afinidade. Nos casos de reações negativas não houve formação de grumos e a reação foi frágil e lenta, sendo portanto considerada negativa.

3.2.2 Detecção de *Salmonella* spp. pelo método rápido imunocromatográfico

A detecção de *Salmonella* spp. foi realizada através da utilização do teste rápido imunocromatográfico *Singlepath Salmonella* (Merck-Millipore), de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, 25g de cada amostra foram adicionadas em 225mL de Água Peptonada Tamponada (APT), e incubadas por 24h a 37°C. Em seguida, 0,1mL do caldo APT foi adicionado em 10mL do caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e, então, incubado por aproximadamente 18h a 42°C. Ao final deste período, os caldos RV que demonstraram turbidez foram utilizados para realizar o teste rápido *Singlepath Salmonella*. Foi retirada uma alíquota de 2mL do caldo RV das amostras e colocado em eppendorfs, os quais foram fervidos em banho-maria por 15 minutos, a suspensão permaneceu a temperatura ambiente antes de ser utilizada. Com o auxílio de uma micropipeta, foram aplicados 160 µL no teste rápido e após 20 minutos foi realizada a leitura final do teste (figura 12). Como controle positivo, foi utilizada uma cepa padrão (*S. Typhimurium* ATCC 14028).

Figura 12. Aplicação da amostra no dispositivo do teste rápido imunocromatográfico.



Fonte: Arquivo pessoal.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o teste rápido Singlepath *Salmonella* (Merck-Millipore), 83,33% (10/12) das amostras foram positivas para *Salmonella* spp. (figuras 13 e 15). Dessas, duas amostras obtiveram resultado fraco positivo no teste, e foram consideradas positivas. Pela metodologia convencional de isolamento, 66,7% (8/12) das amostras apresentaram-se positivas para *Salmonella* spp. (quadro 3 e figura 14). Assim, as amostras que contém este patógeno são consideradas impróprias para consumo humano, segundo a RDC nº 12 da ANVISA (BRASIL, 2001b). A diferença no percentual de ocorrência de *Salmonella* spp. entre o teste rápido e a análise convencional, pode ser explicada pelo fato do teste rápido ser realizado diretamente através da cultura do caldo RV. Desta forma, além de *Salmonella* spp, populações de diferentes bactérias competidoras poderiam estar contidas na alíquota retirada para realização do teste, mesmo que em uma quantidade inferior.

Já na análise convencional, os resultados negativos podem ser justificados, através dos testes bioquímicos e sorológicos não característicos para a confirmação do patógeno. Sendo assim, a ausência do patógeno nas placas pode ocorrer, pois segundo Almeida et al. (2012), *Salmonella* sp. possui baixa capacidade competitiva em relação a bactérias do grupo coliformes e do gênero *Staphylococcus*. De acordo com Melo et al. (2013), a presença de bactérias lácticas e bactérias do grupo coliforme contribuem para acidificação no meio, tornando o mesmo adverso à sobrevivência de *Salmonella*. Assim, este ambiente pode resultar na sua inativação ou em números indetectáveis em alimentos, em situações que apresentam baixa contaminação inicial.

De forma semelhante Garcia et al. (2016), relataram a presença de *Salmonella* sp. em 67% das amostras de queijos frescos artesanais comercializados na região norte de Minas Gerais. Santana (2008), detectou a presença deste micro-organismo em 26,7% das amostras de queijo de coalho vendidos em Aracaju, SE. Já Mendes et al. (1999), avaliaram queijo de coalho comercializado em Recife, oriundos de 15 municípios de Pernambuco e observaram a presença de *Salmonella* sp. em 73,3% dos queijos produzidos. Feitosa et al. (2003), relataram a presença de *Salmonella* sp. em 9% dos queijos analisados, em diferentes microrregiões do estado do Rio Grande do Norte. Os resultados desse trabalho diferem dos obtidos por Amorim et al. (2014) e Melo et al. (2009), que não observaram a presença deste micro-organismo em queijos Minas padrão.

Como *Salmonella* spp. é considerado o principal causador de DTAs, a alta ocorrência deste em produtos de origem animal, denota uma preocupação para a saúde pública.

Quadro 3. Resultado da presença de *Salmonella* spp. em amostras de queijo coalho analisadas através de teste rápido imunocromatográfico e análise convencional.

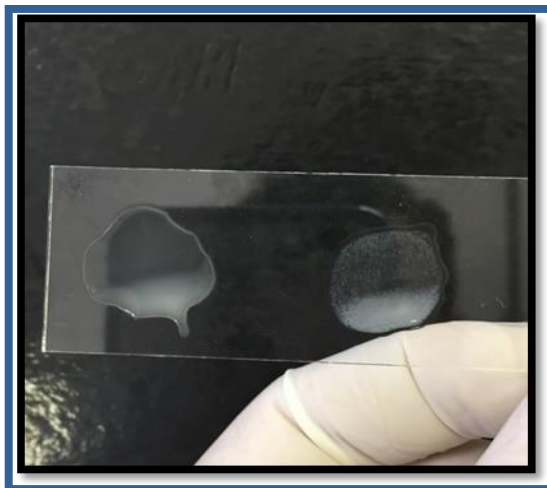
Amostra	Convencional	Rápido
Q1.1	Negativo	Negativo
Q1.2	Positivo	Positivo
Q2.1	Positivo	Positivo
Q2.2	Negativo	Fraco positivo
Q3.1	Positivo	Positivo
Q3.2	Negativo	Fraco positivo
Q4.1	Positivo	Positivo
Q4.2	Negativo	Negativo
Q5.1	Positivo	Positivo
Q5.2	Positivo	Positivo
Q6.1	Positivo	Positivo
Q6.2	Positivo	Positivo

Figura 13. Teste utilizado como controle positivo com inoculação de *Salmonella* sp.⁴



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 14. Testes sorológico para *Salmonella* spp.⁵

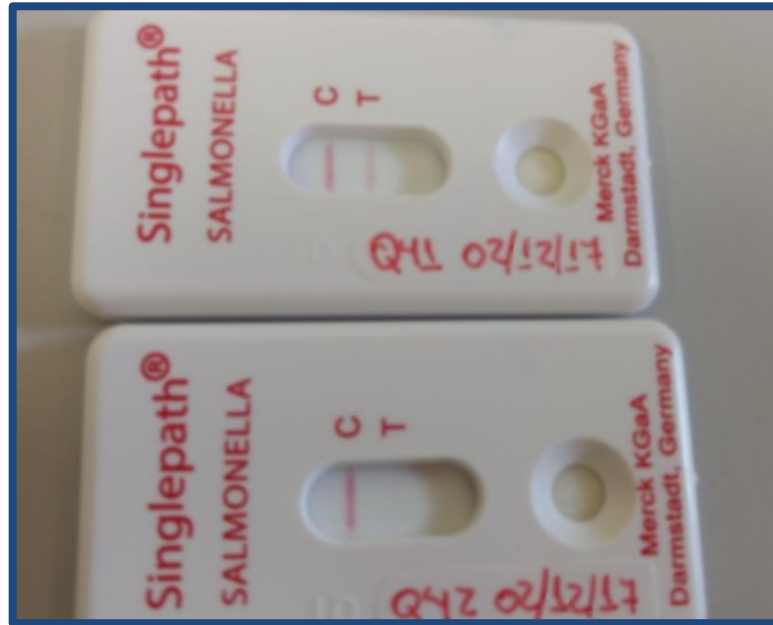


Fonte: Arquivo pessoal.

⁴ De acordo com o fabricante, esperou-se um tempo de 20 minutos para avaliação do resultado, sendo usado como controle positivo uma cepa padrão (*S. Typhimurium* ATCC 14028). Uma amostra é considerada positiva se em 20 minutos ou antes desse tempo, as linhas vermelhas aparecerem nas zonas: teste (T) e controle (C), e negativa se nenhuma linha vermelha aparecer na zona de teste (T), mas aparecer claramente na zona de controle (C) 20 minutos após a aplicação da amostra no dispositivo.

⁵ Sendo flagelar (direito) e o somático (esquerdo). É observado a reação de aglutinação no anti-soro flagelar.

Figura 15. Amostras submetidas ao teste rápido.⁶



Fonte: Arquivo pessoal.

⁶ Amostra Q.4.1 (Positiva) e Amostra Q.4.2 (Negativa).

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o presente estudo, demonstram uma alta ocorrência de *Salmonella* spp. em queijos de coalho comercializados em feiras livres de Garanhuns, sendo que a contaminação por este patógeno torna o produto impróprio para consumo e oferece um grande risco à saúde da população.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. Bacterial agents of foodborne illness. In: ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 3. ed. Cambridge: RSC Publishing, 2008. p.182-269.

ALCOCER, I.; OLIVEIRA, C. R. M. Detecção rápida de *Salmonella enteritidis* em alimentos por ensaio imunoenzimático ELISA. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 401-408, 2003.

ALMEIDA, A.C. et al. Caracterização da produção de queijo artesanal na região de Montes Claros, norte de Minas Gerais. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.312-320, 2012.

ALMEIDA, M. D.; PENA, P. G. L. Feira livre e risco de contaminação alimentar: estudo de abordagem etnográfica em Santo Amaro. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 35, n. 1, p.110-127, 2011.

ALMEIDA, S. L.; PAIVA JÚNIOR, F. G. de; GUERRA, J. R. F. Representação da produção e consumo do queijo coalho artesanal. **Revista Interdisciplinar de Gestão Social**, v.2, n. 2, 2013.

AMORIM, A. L. B. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 4, p. 364-367, 2014.

ANDRADE, A.S.A. **Estudo do perfil sensorial físico-químico e aceitação de queijo de coalho produzido no Estado do Ceará**. Fortaleza, 2006. Originalmente apresentado como Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, 2006.

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

ÁVILA, C. R.; GALLO, C. R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo “Minas Frescal” comercializados no município de Piracicaba – SP. **Scientia Agrícola**, v. 53, n 1, p. 159-163, 1996.

BAILEY, J. S.; COX, N. A.; BLANKENSHIP, L. C. A comparison of an enzyme immunoassay, DNA hybridization, antibody immobilization, and conventional methods for recovery of naturally occurring salmonellae from processed broiler carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 354, 1991.

BENNETT, A. R. et al. Rapid and definitive detection of Salmonella in foods by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 437-441, 1998;

BEUMER, R. R.; BRINKMAN, E.; ROMBOUTS, F. M. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella* spp.: a comparison with other methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 363-374, 1991.

BLACKBURN, C. de W. Rapid and alternative methods for the detection of Salmonellas in foods. **J. Appl. Bacteriol**, v. 75, p. 199-214, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146**, de 07 de março de 1996.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 30**, de 26 de junho de 2001. Diário oficial da União, Brasília, 2001a.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12**, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n. 7-E, p. 45-53. 10 jan. 2001b.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62**, de 26 de Agosto de 2003. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-sda-62-de-26-08-2003,665.html>> Acesso em: 25 jan. 2018.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Febre Tifóide. In: GUIA de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. p.350-363.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de Salmonella spp.**: diagnóstico laboratorial do gênero Salmonella. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. p. 20.

_____. Secretaria Estadual de Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Secretaria-Executiva de Vigilância em Saúde, 2015.

_____. Ministério da Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. 2017. Disponível em:

<<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017>>. Acesso em: 7 jan. 2018.

CAVALCANTE, J. F. M. **Sistema de apoio à decisão na produção de leite e queijo Coalho com segurança alimentar**. 2005. Tese (Doutorado em: Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2005.

BRASIL. IBGE. **Censo Demográfico 2010**: densidade demográfica preliminar (Habitantes/Km²). Disponível em: <<https://censo2010.ibge.gov.br/sinopseporsetores/?nivel=st>>. Acesso em: 28 dez. 2017.

COÊLHO, J. D.; PINHEIRO, J. C. V. Grau de organização entre os feirantes e problemas por eles enfrentados nas feiras livres de Cascavel e de Ocara, no Ceará. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 47., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SOBER, 2009.

COLLA, C. et al. Escolha da feira livre como canal de distribuição para produtos da Agricultura Familiar de Cascavel - PR. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 45., 2007, Londrina. **Anais...** Londrina: SOBER, 2007.

CONNOR, B.A.; SCHWARTZ, E. Typhoid and paratyphoid fever in travellers: the lancet infectious diseases, London, v.5, n. 10, p. 623-628, 2005. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 42, n. 8, p. 584-591, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16183516>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

DANTAS, D. S. **Qualidade Microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município de Patos, PB**. Campina Grande, 2012. Originalmente apresentado como Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campina Grande, 2012.

_____. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município de Patos, Estado da Paraíba. **ACSA – Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 9, n. 3, p.110-118, 2013.

DICKEL, E. L. et al. Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de Salmonella enteritidis, S. typhimurium, S. gallinarum e S. pullorum em carne de frango contaminada artificialmente. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1/3, p. 5-10, 2005.

DUARTE, D. A. M. et al. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no Estado do Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 297-302, 2005.

FEITOSA, T. et al. Pesquisa de salmonella sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, 2003.

FENG, P. Rapid methods for the detection of foodborne pathogens: current and next-generation Technologies. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. (eds.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 3. ed. Washington: ASM Press, 2007. Cap.43, p.911-934.

FERNANDES, R. **Microbiology handbook: dairy products**. 2. ed. Leatherhead: Leatherhead Food International Ltda, 2009.

FORSYTHE, S. J. Ferramentas de gestão da segurança de alimentos. In: FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. Cap. 8, p. 375- 389.

FORTUNA, J. L.; FRANCO R. M. Pequeno dossiê epidemiológico da Salmonella, como causadora de infecções alimentares. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo. v. 19, n. 128, p. 33-44, 2005.

FUNG, D. Y. Rapid methods and automation in food microbiology: a review. **Food Reviews International**, v. 10, n. 3, p. 357-375, 1994.

FUSCO, V.; QUERO, G. M. Culture-dependent and culture-independent nucleic-acid-based methods used in the microbial safety assessment of milk and dairy products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 493-537, 2014.

FRANCO, B.D.G.M. Métodos alternativos de análise microbiológica: uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 2, p. 229-234, 1999.

FRANCO, B. D. G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Ateneu, 2004. 182 p.

GARCIA, C. C. H.; HOFFMANN, F. L.; BUENO S. M. Monitoramento microbiológico de lanches vendidos por ambulantes na parte central de São José do Rio Preto, SP. **Hig. Alim**, v. 11, n. 75, p. 48-51, 2000.

GARCIA, J. K. S. et al. Qualidade microbiológica de queijos frescos artesanais comercializados na região do norte de Minas Gerais. **Cad. Ciênc. Agrá.**, Montes Claros, v.8, n. 2, p. 58-65, 2016.

GAST, R. K.; Salmonella infections. In: SAIF, Y. M. et al. **Diseases of Poultry**, 12. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2008. p.619.

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

_____. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3. ed. Barueri: Manole, 2008, 986 p.

GIESE, J. Rapid microbiology testing kits and instruments. **Food Technology**, v. 49, n. 7 p. 64-71, 1995.

GIOMBELLI, A. Método tradicional clássico para detecção de salmonella em alimentos: um problema técnico bastante complexo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, n. 68/69, v. 4, p.58-61, 2000.

GRIFFITHS, M. W. C. Rapid methods for assessing microbiological quality of foods. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 291-308, 1995.

HENDRIKSEN, R. S. et al. Global Monitoring of Salmonella serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001-2007. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 8, p. 887-900, 2011.

HUMPRHEY, T. J. Numbers of *Salmonella enteritidis* in the contents of naturally contaminated hens' eggs. **Epidemiology and Infections**, v. 106, n. 3, p. 489-494, 1991.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganismos de los alimentos**. Acribia: Zaragoza, 2002.

LEVINSON, W. JAWETZ, E. International commission on microbiological specification for foods. _____. **Microbiologia médica e imunologia**. 7. ed. Porto Alegre. Artmed, 2005. p. 133-136.

MELO, A. C. M.; ALVES, L. M. C.; COSTA, F. N. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo tipo Minas Padrão comercializado na cidade de São Luís, MA. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 547-51. 2009.

MELO, F. D. et al. Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. 1, p. 1-7, 2013.

MENDES, E.S. et al. Staphylococcus aureus, Salmonella sp. e coliformes em queijos de “coalho” comercializadas em Recife. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 66/67, p. 122-126, 1999.

MENEZES, M.F.C. et al. Microbiota e conservação do leite. **REGET - Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, RS, v. 18, p. 76-89, 2014.

MILLOGO, V. et al. Raw milk hygiene at farms, processing units and local markets in Burkina Faso. **Food control, Guildford**, v. 21, n. 7, p. 1070-1074, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713510000046>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

MOREIRA, N. M. **Estudo sobre a Salmonella sp. e seus mecanismos de resistência a antibióticos**. Goiana, 2012. Originalmente apresentado como Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás, Goiana., 2012.

NASSU, R.T. et al. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no estado do Ceará. **Higiene alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 89, p. 28-36, 2001.

NOTERMANS, S.; VERDEGAAL, A. H. Existing and emergin foodborne diseases. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 15, p. 197-205, 1992.

OLSON, W. P. (ed.). **Automated microbial identification and quantification**: technologies for the 2000. Buffalo Grove: Interpharm Press, 1996.

ORDÓÑEZ PEREDA, Juan A; CAMBERO RODRÍGUEZ, María Isabel. **Tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 2 v.

PAIM, S. D. **Perfil de excreção de Salmonella em suínos ao abate e presença de carcaças positivas no pré-resfriamento**. Porto Alegre, 2016. Originalmente apresentado como

Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2016.

PATEL, P. (ed.) **Rapid analysis techniques in food microbiology**. Lodon: Blankie Academic & Professional, 1994.

PERNAMBUCO. Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária do Estado de Pernambuco. **Institui a Inspeção e Fiscalização Agropecuária. Assembleia Legislativa do Estado de Pernambuco**. 1999.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

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

REZENDE, D. C. de. **Estratégia de coordenação e qualidade na cadeia de queijos finos**. Rio de Janeiro, 2004. Originalmente apresentado como Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

RONCADA, M. J.; CORREIA, M. Características microscópicas de queijos prato, mussarela e mineiro comercializados em feiras livres da Cidade de São Paulo. **Rev Saúde Pública**, v. 31, n. 3, p. 296-301. 1997.

RUWER, C. M.; MOURA, J. F.; GONÇALVES, M. J. F. Surtos de doenças transmitidas por alimentos em Manaus, Amazonas (2005-2009): o Problema do Queijo Coalho. **Revista Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 18, n. 2 p. 60-66, 2011.

SANTANA, R. F. et al. Qualidade microbiológica de queijo coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1517-1522, 2008.

SHINOHARA, N. K. S. et al. Samonella spp., importante agente patógeno veiculado em alimentos. **Revista Ciências & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

SHELOBOLINA, E. S. et al. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, p. 2959-2965, 2004.

SILVA JUNIOR, E. A. S. **Manual de controle higiênico sanitário em serviços de alimentação**. 6. ed. São Paulo: Varela, 2008.

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

SILVA, R. A. et al. Avaliação da microbiota bacteriana do queijo Coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1732, 2012.

SILVEIRA, M. L. R.; BERTAGNOLLI, S. M. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado informalmente em feiras livres no município de Santa Maria. **Vigilância Sanitária Debate**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 75-80, 2014. Disponível em: <<https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/135/120>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

TEIXEIRA, F.T. **Manual de produção de queijo de coalho**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil; Rio de Janeiro: Embrapa-ctaa, 1996.

TIEJEN, M.; FUNG, D. Y. C. Salmonellae and Food Safety. **Crit. Rev. Microbiol.** Cleveland, v. 21, p. 53-83, 1995.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TSOLIS, R. M. et al. Minireview – How to become a Top Model. Impact of Animal Experimentation on Humana *Salmonella* diseases research. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 5, p. 1806-1814, 2011.

VON BLANKENFELD-ENKVIST, G.; BRÄNNBACK, M. Technological trends and needs in food diagnostics. **National Technology Agency**, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The burden of foodborne diseases is substantial**. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborneiseases/ferginfographics.pdf?ua=1>. Acesso em: 01 dez. 2017.