

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

AMANDA GIAZZI

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS POTENCIALMENTE
PATOGENICOS E RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS, ISOLADOS
DE QUEIJOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA
2013

AMANDA GIAZZI

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS POTENCIALMENTE
PATOGENICOS E RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS, ISOLADOS
DE QUEIJOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciana Furlaneto-Maia

LONDRINA
2013

AMANDA GIAZZI

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS POTENCIALMENTE PATOGENICOS
E RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS, ISOLADOS DE QUEIJOS**

Monografia apresentada ao Curso de Tecnologia em Alimentos da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná *campus* Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Caroline Maria Calliari
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dra. Luciana Furlaneto-Maia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Orientador

Londrina, 17 de setembro de 2013

RESUMO

GIAZZI, Amanda. Identificação de micro-organismos potencialmente patogênicos e resistentes a antimicrobianos, isolados de queijos. 2013. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2013.

O queijo Minas Frescal é um dos queijos mais populares do Brasil, de ampla aceitação no mercado. Quando produzido por pessoas inexperientes de forma artesanal, pode ocorrer à contaminação por diversos micro-organismos ao alimento, sendo alguns patogênicos ou produtores de metabólitos microbianos que podem causar intoxicações e/ou infecções alimentares nos seres humanos, como a *Salmonella* e a *Escherichia coli*, de forma a comprometer tanto a qualidade do queijo quanto a segurança com relação à saúde do consumidor. Por esse motivo, o presente estudo avaliou a presença de *Salmonella* e *E. coli* enteropatogênica (EPEC) de isolados de queijo Minas Frescal, através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase, e a susceptibilidade destes a antimicrobianos de uso clínico. *Salmonella* foi identificada em 21,15% das amostras analisadas, enquanto que a *E. coli* EPEC estava presente em 5,26%. Os percentuais de resistência da *Salmonella* a antimicrobianos foram: 29,17% apresentaram resistência a um ou dois antibióticos, enquanto que os isolados S18Q.6, S34Q.3 e S36Q.1 foram multirresistentes. Para os isolados de *E. coli*, 100% apresentaram-se sensíveis a 7 dos antibióticos testados, contudo, eritromicina obteve 58,82% dos isolados intermediários e uma amostra resistente. Apenas a amostra 41Q.1 apresentou resistência a mais de um antibiótico. Os queijos analisados foram considerados impróprios para o consumo porque apresentaram os micro-organismos estudados (confirmados por PCR) e com resistência a pelo menos um antimicrobiano testado.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. *Salmonella*. PCR.

ABSTRACT

GIAZZI, Amanda. Identification of potential pathogenic microorganisms and antimicrobial resistance, isolated from cheese. 2013. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2013.

The “Minas Frescal” cheese is one of the most popular cheeses produced in Brazil, with a large acceptance in market. When it is produced in an artisanal way by inexperienced persons the product contamination by several microorganisms could happen. Some of those microorganisms could be pathogenic or producers of metabolic substances which could cause food intoxications and/or human infections, as *Salmonella* and *Escherichia coli*, wherefore the cheese quality and the consumer safety are harmed. According with this panorama the present study evaluated the presence of *Salmonella* and *E. coli* enteropathogenic (EPEC) isolated from “Minas Frescal” cheese by the Polimerase Chain Reaction technique and the microorganisms susceptibility to clinical use antimicrobial. *Salmonella* was identified in 21,15% of analyzed samples, whereas, *E. coli* EPEC were present in 5,25%. The resistance percentage of *Salmonella* to the antimicrobial were: 29,17% presented resistance to one or two antibiotics, whereas the isolated S18Q.6, S34Q.3 and S36Q.1 were multiresistant. The *E. coli* isolated were sensitive to seven tested antibiotics (100%). However, eritromicine obtained 58,82% from intermediate isolated and one resistant sample. Only the sample 41Q.1 presented resistance to more than one antibiotic. The analyzed cheese were considerate improper to consumption because of the presence of the studied microorganisms (PCR confirmed) and with resistance at least to one tested antimicrobial.

Key-words: *Escherichia coli*. *Salmonella*. PCR.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	8
2.2. OBJETIVOS GERAIS	8
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3. REFERENCIAL TEÓRICO	9
3.1. QUEIJO MINAS FRESCAL	9
3.1.1. Contaminação por Patógenos	11
3.2. COLIFORMES	12
3.2.1. Coliformes totais e termotolerantes	12
3.2.2. <i>Escherichia coli</i>	13
3.3. SALMONELLA SPP.....	14
3.4. DETECÇÃO DE PATÓGENOS ALIMENTARES	15
3.4.1. Métodos Convencionais.....	15
3.4.2. Métodos Moleculares	15
3.4.2.1. Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase.....	16
3.5. SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO	20
4.2. REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS	20
4.3. TESTES BIOQUÍMICOS	20
4.4. IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA	21
4.4.1. Extração de DNA de <i>Escherichi coli</i> e <i>Salmonella</i>	21
4.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	21
4.5. SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

O queijo “Minas Frescal” é um dos queijos mais populares do Brasil e de ampla aceitação no mercado. É uma variedade não maturada, para consumo imediato e de curta durabilidade no mercado (FURTADO, 1999). Quando produzido por pessoas inexperientes de forma artesanal, pode ocorrer a contaminação por diversos micro-organismos, de forma a comprometer tanto a qualidade do queijo quanto a segurança com relação à saúde do consumidor.

A manipulação incorreta durante e depois do processo de fabricação provoca a contaminação dos alimentos por micro-organismos patogênicos ou produtores de metabólitos que podem causar intoxicações e/ou infecções alimentares nos seres humanos (CÂMERA *et al.*, 2002). Portanto, a contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, quanto para a saúde pública pelas doenças transmitidas por alimentos (FEITOSA *et al.*, 2003).

Na cidade de Londrina-PR, é comum o comércio de queijo tipo Minas frescal de fabricação artesanal, principalmente em feiras livres da cidade. Diversos micro-organismos podem ser comumente encontrados nesses produtos, entre os quais destacam-se *Escherichia coli* e *Salmonella*, micro-organismos diretamente relacionadas à manipulação inadequada pelos produtores e falta de higiene durante a produção do alimento. Assim, a rápida e precisa identificação de bactéria patogênica em amostras de alimentos, bem como a determinação da sensibilidade destes a antimicrobianos de uso clínico são importantes para garantir a qualidade do alimento e localizar surtos de patógenos (BHAGWAT, 2003).

Desta forma, este estudo visa identificar *Escherichia coli* e *Salmonella* de queijo Minas Frescal utilizando a técnica de PCR, a partir do DNA de amostras identificadas pelos testes bioquímicos e avaliar sua resistência a antimicrobianos de uso clínico.

2. OBJETIVOS

2.2. OBJETIVOS GERAIS

Confirmar a presença de *Salmonella* sp e *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC) através da técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e submetê-las ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar testes bioquímicos confirmatórios para *Salmonella* sp e *Escherichia coli* previamente isoladas de amostras de queijos tipo Minas Frescal;
- Proceder a confirmação genotípica para *Salmonella* sp;
- Verificar genotipicamente sorotipos patogênicos de *E. coli*.
- Analisar os isolados quanto à sensibilidade a antimicrobianos;

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. QUEIJO MINAS FRESCAL

De acordo com o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do queijo Minas Frescal (BRASIL, 1997), entende-se por queijo Minas Frescal, o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como um queijo semi-gordo com alta atividade de água, baixo pH e 1,6% de NaCl, podendo ser consumido fresco (FREITAS et al., 1993).

O queijo tipo Minas Frescal é um produto de tecnologia simples, tipicamente nacional, com alta aceitação comercial no país, todavia, mediante o comprometimento da sua qualidade microbiológica e sensorial, pesquisadores de diferentes partes do mundo têm se manifestado quanto à importância da qualidade sanitária deste produto (SILVA; SOUZA, 2006).

Tendo em vista evitar riscos à saúde, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária por meio da Resolução da Diretoria Colegiada N°. 12 de 02 de janeiro de 2001 (RDC N°12) (BRASIL, 2001) estabelece o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, no qual, para queijos de alta umidade (55%) como é o caso do queijo Minas Frescal, deve ser quantificados os micro-organismos coliformes a 45°C ($5 \times 10^2/g$), estafilococos coagulase positiva ($5 \times 10^2/g$), *Salmonella* spp. (ausência em 25 g) e *Listeria monocytogenes* (ausência em 25 g). O item 5.9 desta resolução determina as considerações sobre os grupos de micro-organismos pesquisados, e o item subsequente 5.9.1. dispõe que a denominação de "coliformes a 45°C" é equivalente à denominação de "coliformes de origem fecal" e de "coliformes termotolerantes" e que, quando determinada a presença de *E. coli*, faz-se necessário constar no laudo analítico.

O Ministério da Saúde (MS) e o MAPA vêm unindo-se para garantir que os produtos oferecidos pelos produtores aos consumidores estejam em boas condições higiênico-sanitárias e, para tanto, ressalta-se a importância do cumprimento das

legislações vigentes, como a RDC N°12, (BRASIL, 2001), a Instrução Normativa N°51 (BRASIL, 2002) e o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 1974).

Apesar das exigências legais quanto à qualidade do leite destinado à produção de queijos (higienizado, pasteurizado) (BRASIL, 1974), é intensa a comercialização do queijo tipo Minas de forma irregular, principalmente nas indústrias de pequeno porte e estabelecimentos com produção artesanal que, muitas vezes, encontram-se ausentes de fiscalização por parte dos órgãos governamentais (DIAS, 2011).

Segundo Silva e Fernandes (2005) cerca de 40% de toda produção brasileira de leite é comercializada sem qualquer tipo de fiscalização, o que, em parte, justifica a informalidade e baixa qualidade na produção dos derivados, além de apontar a necessidade de uma fiscalização mais rigorosa.

A produção de queijo Minas Artesanal tem sido uma importante fonte de renda na agricultura familiar, tendo o estado de Minas Gerais a maior produção desse tipo de queijo no Brasil (EMPRESA DE ASSISTENCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL, 2004). Porém, quando produzido por pessoas inexperientes de forma artesanal, pode ocorrer à contaminação por diversos micro-organismos ao alimento, sendo alguns patogênicos ou produtores de metabólitos microbianos que podem causar intoxicações e/ou infecções alimentares nos seres humanos, de forma a comprometer tanto a qualidade do queijo quanto a segurança com relação à saúde do consumidor (LOGUEIRO; ALEIXO, 2001).

Segundo Furtado (1999), a qualidade dos queijos fabricados é diretamente proporcional à qualidade do leite utilizado como matéria-prima, fato que, para alguns autores, representa o ponto crítico de uma série de eventos que determinam a qualidade do queijo. A qualidade insatisfatória do leite cru e, conseqüentemente, dos leites pasteurizados e esterilizados, assim como dos seus derivados, está relacionada a deficiências no manejo e higiene de ordenha, índices elevados de mastite, manutenção e desinfecção inadequadas dos equipamentos, refrigeração ineficiente ou até inexistente, mão-de-obra desqualificada, entre outros (BRAMLEY e MACKINNON, 1990).

Embora existam legislações que amparem e orientem o produtor na fabricação de queijo Minas Artesanal, como as do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) com a Portaria N° 818, de 12 de dezembro de 2006 que dispõe sobre o

Regulamento Técnico de Produção do Queijo Minas Artesanal (INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA, 2006) e a Portaria nº 523, de 3 de julho de 2002 que dispõe sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e Boas Práticas na Manipulação e Fabricação do queijo Minas Artesanal (INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA, 2002), e o cuidado em cadastrar os produtores, pesquisadores vêm apontando a presença de micro-organismos patogênicos no produto (SILVA; LEITÃO, 1980).

3.1.1. Contaminação por Patógenos

O queijo Minas frescal apresenta grande susceptibilidade a contaminações microbianas com possibilidade de serem originadas a partir do leite utilizado como matéria-prima ou através de contaminações cruzadas durante e/ou após processamento. As alterações sensoriais e consequente perda da qualidade do produto resultante das contaminações podem, em poucos dias, tornar o queijo inaceitável ou mesmo impróprio para o (ROCHA; BURITI; SAAD, 2006).

As bactérias do grupo coliforme têm sido consideradas os principais agentes causadores de contaminação associados à deterioração de queijos, com fermentações anormais e, conseqüentemente, estufamento precoce dos produtos (OLIVEIRA et al., 1998; ALMEIDA; FRANCO, 2003). Este grupo bacteriológico incluem todos os bacilos Gram negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e capazes de fermentar a lactose com produção de gás. Compreende bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente, entretanto, representantes deste grupo são facilmente destruídos pelas temperaturas de pasteurização, dessa forma, sua presença em alimentos processados é indício de contaminação pós-processamento, evidenciando práticas de higiene e sanitização inadequadas (SILVA et al., 2001).

A contaminação de queijos por micro-organismos merece destacada importância ao considerar que bactérias patogênicas e enterotoxigênicas como *Salmonella*, com produção de toxinas, têm sido comumente encontradas em derivados lácteos (ALMEIDA; FRANCO, 2003). Estas bactérias e metabólitos

microbianos podem causar infecções e ou intoxicações alimentares no ser humano (CÂMARA et al., 2002).

Levantamento epidemiológico realizado em diversos países posicionam as salmonelas entre os agentes patogênicos mais frequentemente encontrados em surtos de toxinfecção alimentar, tendo como um dos veículos de transmissão mais importantes, os produtos lácticos (ÁVILA; GALLO, 1996).

3.2. COLIFORMES

3.2.1. Coliformes totais e termotolerantes

Pertencem ao grupo dos coliformes totais as bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Os coliformes são bacilos Gram negativos, anaeróbicos facultativos, não esporogênicos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás a 37°C em 24- 48 horas, para todos os alimentos (LANGRAF, 2005). São pertencentes a esse grupo os gêneros *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, entretanto, apenas a *E. coli* encontra no trato intestinal do homem ou animal como seu habitat primário. Os demais gêneros podem ser encontrados em vegetais e solo, além das fezes.

A existência de coliformes totais nos alimentos, como queijos, não indica necessariamente contaminação fecal ou a presença de coliformes termotolerantes. Todavia, este grupo de micro-organismo indica, com maior segurança, as condições higiênico-sanitárias do produto (LANDGRAF, 2005). As bactérias do grupo coliformes são consideradas como agentes causadores de contaminação associada à deterioração de alimentos, e apresentam-se capazes de provocar fermentações anormais e estufamento precoce dos produtos (OLIVEIRA et al., 1998; ALMEIDA; FRANCO, 2003).

3.2.2. *Escherichia coli*

E. coli pertence a um grupo de micro-organismos denominados coliformes fecais e termotolerantes, cuja presença em alimentos indica contaminação de origem fecal. Quando encontrados em índices elevados, além de indicar más condições higiênicas, evidencia, também, a possibilidade da presença de outros patógenos no produto (PEREIRA *et al.*, 1999).

E. coli está associada a infecções intestinais e, deste gênero, foram classificadas sorotipos com base na identificação de propriedades de virulência específicas, de sinais clínicos e de sintomas gerados no hospedeiro (NATARO; KAPER, 1998). Os principais sorotipos compreendem: *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC). Cada classe cai dentro de um subgrupo sorológico e manifesta características distintas na patogênese (NATARO; KAPER, 1998).

O sorotipo EPEC, quando ingerido, induz a uma diarreia que por vezes pode apresentar sangramento. Sua presença é a principal causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento, associados ao consumo de água contaminada e produtos cárneos. A patogenicidade do sorotipo EPEC envolve uma proteína codificada plasmídeos referida como EPEC fator de aderência (EAF), que permite a aderência de bactérias às células intestinais do hospedeiro (TODAR, 2008).

A adesão das estirpes de EPEC para a mucosa intestinal é um processo muito complicado e produz efeitos dramáticos na ultra-estrutura das células, resultando em rearranjos de actina. O fenômeno é às vezes chamado de "apego e discreto" das células. Estirpes de EPEC são ditos "moderadamente invasivo", o que significa que eles não são tão invasivos como *Shigella*, e ao contrário de ETEC, causam uma resposta inflamatória. A diarreia e outros sintomas de infecções EPEC provavelmente são causados por invasão bacteriana de células hospedeiras e interferência com a transdução de sinal celular, e não por produção de toxinas (TODAR, 2008).

3.3. SALMONELLA SP

O gênero *Salmonella* sp é caracterizado como bacilos pertencentes à família Enterobacteriaceae e são anaeróbios facultativos, não produtores de esporos, e apresentam resultado negativo quando submetidos ao teste de Gram. Produzem gás a partir de glicose e utiliza o citrato como sua única fonte de carbono (FRANCO, 2003). O micro-organismo apresenta crescimento rápido em meios de cultura a uma temperatura de 37°C, com o pH em torno de 7 (sete) (HOLT, 1994).

Bactérias do gênero *Salmonella* são divididas em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. *S. enterica* é subdividida em seis subespécies sendo a subespécie (subespécie *enterica*) a que apresenta a maioria dos mais de 2.400 sorovares identificados e a que compreende os sorogrupos A a H, sendo as cepas A, B, C1, C2, D e E as responsáveis por aproximadamente 99% das infecções em humanos e animais de sangue quente (POPOFF et al, 2001).

S. enterica subespécie *enterica* sorovares Typhimurium e Enteritidis são os mais envolvidos em salmonelose humana (VUGIA et al. 2004). Atualmente, além de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, os sorovares de salmonelas mais frequentemente envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar são *S. Heidelberg*, *S. Newport*, *S. Infantis*, *S. Agona*, *S. Montevideo*, e *S. Saint Paul* (CHIU; LAM; HEDLEY, 2005).

Salmonelas estão amplamente distribuídas no ambiente e residem, primariamente, no trato intestinal de aves, répteis, animais de estimação e de criação para o consumo, e de humanos (KERR et al., 1992). A transmissão de salmonelas ao homem ocorre, geralmente, pela ingestão de alimentos ou água contaminados (FAVRIN; JASSIM; GRIFFITHS, 2001). As fontes mais comuns de salmonelas são carnes, principalmente de frango, leite e ovos.

Os micro-organismos pertencentes ao grupo *Salmonella* sp são capazes de produzir uma variedade de fatores de virulência, dos quais destaca-se a capacidade de adesão aos receptores celulares das células dos hospedeiros, de modo a ocorrer a sobrevivência intracelular (KATTOM; NOLAN; BROWN, 1995) e o poder de penetrar nas células intestinais, colonizar e viver *in situ* podendo ir para o tecido sub epitelial através da destruição das microvilosidades (PORTER; CURTISS, 1997).

3.4. DETECÇÃO DE PATÓGENOS ALIMENTARES

3.4.1. Métodos Convencionais

São técnicas desenvolvidas e descritas em publicações internacionais aceitas como métodos oficiais, empregadas nos laboratórios de pesquisa brasileiros. Dentre esses métodos, destacam-se o “Bacteriological Analytical Manual” (BAM), publicado pela “United States Food and Drug Administration” (FDA) e pela “Association of Official Analytical Chemists International” (AOAC International); o “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods”, editado pela “American Public Health Association” (APHA) e o “Microorganisms in Foods – their significance and methods of enumeration”, publicado pela “International Commission on Microbiological Specifications for Foods” (ICMSF). Existem ainda outros métodos recomendados por outras associações como a “International Organization for Standardization” (ISO), a “International Dairy Federation” (IDF) entre outras (FRANCO,2003).

Embora os métodos convencionais sejam relativamente baratos e estejam bem estabelecidos, apresentam desvantagens quando comparados aos métodos moleculares, por serem extremamente laboriosos e demandarem tempo para a liberação do laudo final (DIAS, 2011).

3.4.2. Métodos Moleculares

A introdução de técnicas mais rápidas de detecção de patógenos surgiu com a necessidade de obtenção dos resultados rapidamente, somado à melhora na produtividade laboratorial e simplificação nos trabalhos, entre outros fatores, tendo em vista que alguns desses métodos moleculares apresentam maior sensibilidade e especificidade do que os convencionais (FRANCO, 2003).

Métodos rápidos têm sido utilizados para estudar a epidemiologia molecular de diversos patógenos bacterianos e, dessa forma, caracterizar a variabilidade

genética de amostras envolvidas em surtos alimentares, definição de grupos predominantes e identificação da origem das amostras virulentas (MACÊDO et al., 2007).

As técnicas de biologia molecular têm sido descritas na literatura como uma forma rápida e adequada para a identificação de cepas patogênicas de *E. coli* há anos, incluindo ensaios de multiplex PCR (RÚGELES, et al., 2010).

Estudos tem sugerido que para cada patótipo de *E. coli* patogênica existe um ou mais genes específicos ou combinação de fatores de virulência responsáveis pela distinção entre estirpes não patogênicas de outros patótipos (SPHIGEL, 2008).

3.4.2.1. Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido um grande avanço no diagnóstico molecular de micro-organismos patogênicos por ser uma técnica altamente sensível, por meio da qual, é capaz de amplificar enzimaticamente pequenas quantidades de seqüências de DNA ou RNA específicas até se obter milhões de cópias da seqüência desejada e, também, capaz de detectar simultaneamente duas ou mais seqüências de DNA (MACEDO et al., 2007; KONEMAM et al., 1997). Assim, constitui uma alternativa importante na detecção de patógenos, como *Escherichia coli* e *Salmonella*, por exemplo, em leite e derivados.

Atualmente, a técnica da reação em cadeia da polimerase é considerada a técnica genética mais utilizada em diagnóstico microbiológico (MALORNY et al., 2003). Desenvolvida primeiramente por Kary B. Mullis em 1985, a PCR permite obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA por meio da ação da enzima Taq DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (primers) sobre um DNA molde. É realizado em um termociclador, equipamento automatizado e computadorizado, que possibilita a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA, por meio de alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo (KONEMAM et al., 1997). A amplificação do DNA segue uma progressão geométrica, de maneira que no vigésimo ciclo há uma produção de mais de um milhão de cópias (MULLIS; FALOONA, 1987) (Figura 1).

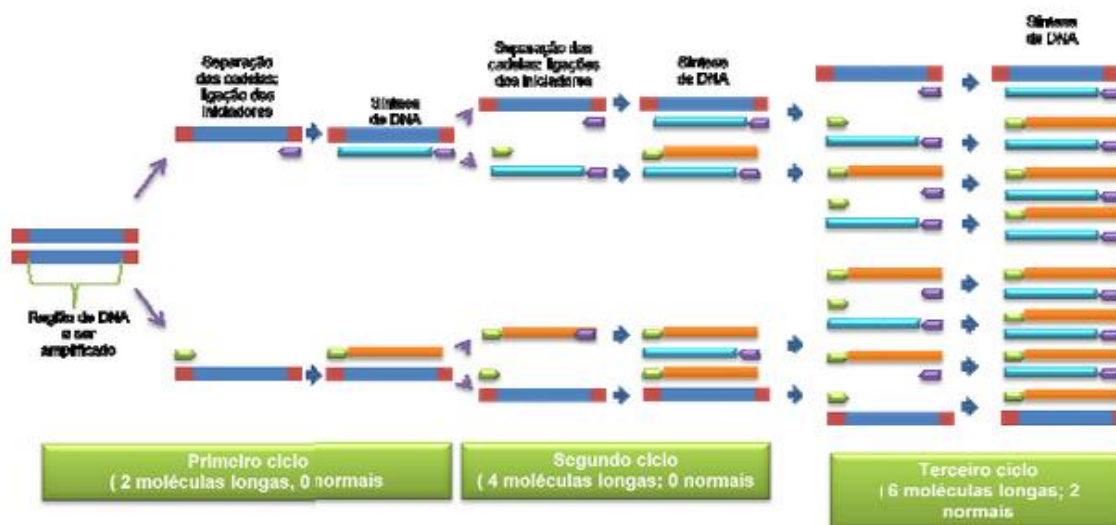


Figura 1. Funcionalidade da PCR- Ciclos de uma reação.
Fonte: BREYER, 2009.

A introdução da PCR, em diagnóstico microbiano, estabeleceu uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura (MARLONY et al., 2003). Esta técnica apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, como maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (BUSH; NITSCHKO, 1999).

3.5. SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Em 1905 Paul Ehrlich demonstrou, por meio de experimentos, a possibilidade da síntese de algumas substâncias capazes de comprometer especificamente as células do micro-organismo infectante, sem causar prejuízo à saúde do hospedeiro. Paul introduziu o conceito de índice quimioterápico, que é a relação entre a dose máxima tolerada e a dose mínima curativa, ou seja, quimioterapia é o emprego de substâncias com alto parasitotropismo (o agente deve possuir uma afinidade específica e seletiva sobre o micro-organismo) e baixo

organotropismo (afinidade do agente e seu efeito sobre o sangue e os tecidos) (BIER, 1990).

A quimioterapia antimicrobiana iniciou-se em 1935, pela descoberta das sulfonamidas, e, em 1940 foi demonstrada a eficácia da penicilina como substância terapêutica. Por 25 anos as pesquisas de agentes quimioterápicos estiveram voltadas para as substâncias de origem microbiana, denominadas de antibióticos, sendo as estreptomicinas, as tetraciclina e os cloranfenicóis, por exemplo, os sucessores da penicilina; isolados originalmente de cultivos de bolores. Posteriormente, outros antibióticos puderam ser sintetizados e, atualmente, a modificação biossintética das moléculas passou a constituir um método promissor na elaboração de novos agentes antimicrobianos (JAWETZ et al, 1998).

Para que um antibiótico possa atuar faz-se necessário sua interação com alguma parte do micro-organismo patogênico em um hospedeiro, podendo esta interação ser iniciada por um processo de transporte ativo específico da célula, com a finalidade de aumentar a concentração intracelular “livre” do antibiótico, além da concentração intracelular que seria atingida por difusão passiva (JAWETZ et al, 1998).

O modo de atuação da maioria dos antibióticos não está totalmente esclarecido, entretanto, os antibióticos podem atuar por meio da síntese da parede celular, inibição da função da membrana celular, inibição da síntese de proteína com a inibição da tradução e transcrição do material genético, ou através da inibição da síntese de ácidos nucleicos (JAWETZ et al, 1998).

Todavia, a resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados atualmente tem surgido como um problema mundialmente importante, devido a menor efetividade de muitas classes de antimicrobianos, decorrente, por vezes, do uso intensivo, ou mesmo, inadequado desses compostos, ocasionando a seleção de patógenos resistentes (GALES et al., 1997). De acordo com MOTA (2005), o termo resistente refere-se aos micro-organismos capazes de crescerem em concentrações de antibióticos habitualmente alcançados no sangue ou tecidos, ou àqueles portadores de mecanismos de resistência específicos, ou seja, resistentes a um determinado agente bactericida.

A resistência aos antimicrobianos encontra-se normalmente associada a um elemento extra-cromossômico ou plasmídios, capazes de serem transferidos entre as bactérias, podendo estas ser da mesma espécie, ou de espécies diferentes

(MENEZES et al., 2004). Pode ser classificada em simples, quando a bactéria resiste à ação de um único antibiótico, ou múltipla, quando o mecanismo bioquímico da resistência para um determinado antibiótico se estende também sobre outros antibióticos (RIVERA et al., 1995).

Nos últimos anos, diversos métodos têm sido aplicados com o intuito de comparar cepas de *E. coli* na tentativa de identificar quais os mecanismos de transmissão e quais as fontes de contaminação. Entre as técnicas fenotípicas utilizadas, o teste de susceptibilidade a antimicrobianos tem sido especialmente usado pelo seu baixo custo e à facilidade de execução, além de contribuir para informar sobre a resistência microbiana (CAMPOS et al., 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Foram analisados 19 isolados de *E. coli* e 52 isolados de *Salmonella* previamente analisados bioquimicamente, provenientes de queijo tipo Minas Frescal, comercializados na cidade de Londrina-PR. Os isolados pertencem à bacterioteca particular da profa Dra Luciana Furlaneto-Maia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Londrina e encontravam-se conservados em glicerol em freezer -80°C.

4.2. REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS

Para a reativação microbiana, uma alíquota de 20 µL de cada isolado foi inoculada em caldo Brain Heart Infusion (BHI), incubada por 24 horas a 37 °C. Após a turvação do meio, realizou-se um inóculo em ágar BHI, e este foi utilizado para a realização dos testes.

4.3. TESTES BIOQUÍMICOS

Os testes bioquímicos foram realizados através da inoculação dos isolados em ágar Citrato de Simmons e ágar Tríplice-açúcar-ferro (TSI), sendo o último utilizado apenas para os isolados de *Salmonella*. As amostras com resultados positivos para os testes bioquímicos seguiram para a extração de DNA com posterior confirmação genotípica via PCR e análise da resistência a antimicrobianos.

4.4. IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA

4.4.1. Extração de DNA de *Escherichi coli* e *Salmonella* sp

Os DNAs genômicos dos micro-organismos foram extraídos utilizando-se a metodologia descrita por SAMBROOK (1989) com algumas modificações sugeridas por JIM (2006). Uma alçada dos isolados provenientes de crescimento em Ágar BHI, foi inoculada em 3 mL de caldo BHI e estes tubos incubados por aproximadamente 24h a 37°C. Após este período, o conteúdo total foi transferido para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspendido em 570 µL de tampão TE (Tris.HCl 10mM, pH8,0; EDTA 1mM, pH8,0), em seguida, adicionou-se 30 µL de SDS 20% (dodecil sulfato de sódio) e 3 µL de proteinase K (2mg/mL).

As células com as soluções foram mantidas em banho maria à 37°C por 2 horas sem agitação, em seguida foram realizadas duas extrações com 500 µL fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Da fase aquosa (superior) foram retirados 500 µL e transferido para microtubo de 1,5 mL, sendo adicionado 10 µL de solução NaCl a 5 M (para uma concentração final 100mM) e precipitado com dois volumes de etanol absoluto gelado. O DNA foi incubado à -20°C overnight, em seguida centrifugado a 12000 rpm por 10min; o precipitado foi lavado com álcool 70% e ressuspendido em 100 µL de TE (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

4.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O oligonucleotídeo iniciador que foi utilizado amplificou a região gênero específico para *Salmonella* (St11 5' GCC AAC CAT TGC TAA ATT GGC GCA 3'; St14 5' GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG G 3'; tamanho de 429 pb) (PAN; LIU, 2002).

O oligonucleotídeo iniciador utilizado para *E. coli*, amplifica a região do gene fator de aderência de EPEC (Eaf F CAA TGG TGC TTG CGC TTG CT; Eaf R GCC GCT TTA TCC AAC CTG GT; 324 pb) (TORNIEPORTH *et al.*, 1995).

A reação da PCR para amplificação dos genes foi realizada em termociclador, utilizando uma mistura de 50µL contendo 1X de tampão PCR, 1,5mM de MgCl₂ (50mM), 0,1mM de cada dNTP (10mM), 1mM de cada oligonucleotídeo, 0,5U da enzima Taq polimerase, 100ng de DNA bacteriano completando-se o volume para 50 µL com água bidestilada estéril. As condições de amplificação utilizadas foram: um ciclo inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s; anelamento a 50°C por 45s e extensão a 72°C por 45s e um ciclo final a 72°C por 5min (AZNAR; ALARÓN, 2003). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo, e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100pb DNA Ladder (Invitrogen®).

4.5. SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

A análise da resistência dos isolados a antimicrobianos foi realizada por meio da técnica de difusão de discos em placas, descrita por NCCLS (2003). Para a realização dos testes, as cepas de *E. coli* e *Salmonella* foram repicadas em placas contendo ágar Mueller Hinton (MH) e incubadas a 37° C por 18 a 20 horas. O inóculo foi preparado pelo método de suspensão direta. Com auxílio de uma alça bacteriológica, três a quatro colônias da bactéria foram suspensas em solução salina estéril. Para acertar a turbidez da suspensão, foi comparado com padrão 0,5 da escala de MacFarland. A seguir, as culturas padronizadas foram semeadas com o auxílio de *swabs* estéreis, em placas contendo ágar MH e, em seguida foram colocados os polidiscos contendo os antimicrobianos (KONEMAN *et al.*, 2001). Os antimicrobianos testados foram: cloranfenicol (CLO- 30µg), gentamicina (GEN- 10 µg), eritromicina (ERI- 10µg), ciprofloxacina (CIP- 5µg), tetraciclina (TET- 30µg), amicacina (AMI- 30µg), norfloxacina (NOR- 10µg), impinen (IPM- 10µg), ampicilina (AMP- 10µg) e ácido nalidíxico (NAL- 30µg). As placas contendo os discos dos antimicrobianos foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após este período, o halo de

inibição formado foi mensurado e analisado utilizando-se tabelas do NCCLS (2003), cujos resultados classificavam as cepas em sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R) (NCCLS, 2003).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se que dos 19 isolados analisados, 89,47% apresentaram-se positivos para a bactéria *E. coli*, sendo que 5,26% mostraram se tratar do sorogrupo EPEC, pela análise molecular de PCR (tabela 1). A Figura 2 mostra o tamanho do amplicon característico para o sorogrupo EPEC.

Tabela 1. Porcentual de confirmação de *E. coli* e sorogrupo EPEC

ISOLADO	CITRATO	PCR
6QI.1	Positivo	—
6QI.5	Positivo	—
6QI.7	Negativo	—
6QI.8	Positivo	—
6Q.1	Positivo	—
6Q.2	Positivo	—
6Q.3	Positivo	+
6Q.4	Negativo	—
39Q.1	Positivo	—
39Q.2	Positivo	—
39Q.4	Positivo	—
40Q.1	Positivo	—
40Q.9	Positivo	—
40Q.11	Positivo	—
41Q.1	Positivo	—
41Q.4	Positivo	—
42Q.1	Positivo	—
42Q.2	Positivo	—
42Q.6	Positivo	—

+: Presença do amplicon para o sorogrupo EPEC

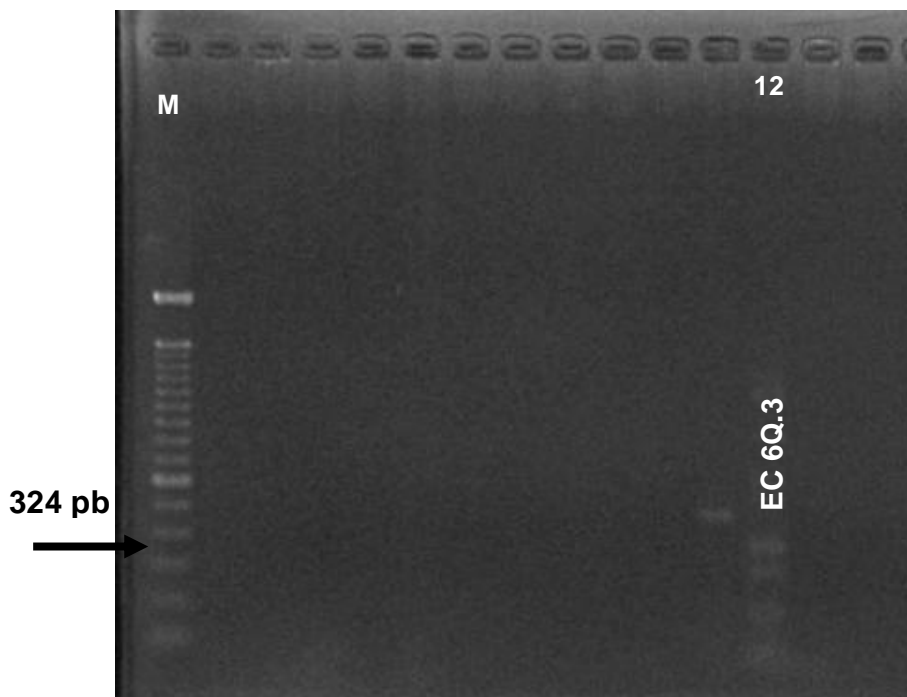


Figura 2. Imagem em Gel de Agarose 1,5%. Bandas compatíveis com gene que identifica o gênero *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) (324 pares de base). M – marcador de peso molecular (100pb); Canaleta 12 corresponde ao isolado Ec 6Q.3- amostra confirmada.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados dos testes fenotípicos e genotípicos para os isolados presuntivos do gênero *Salmonella* sp. Um total de 88,46% dos isolados apresentaram resultados fenotípicos típicos para o gênero, contudo, 21,15% confirmaram como *Salmonella* pela técnica da PCR.

Tabela 2. Resultados encontrados no teste fenotípico e genotípico dos isolados de *Salmonella* sp.

ISOLADOS	CITRATO	TSI	PCR
8Q.3	Positivo	Amarelo + Preto + Gás	—
8Q.4	Positivo	Amarelo + Gás	—
8Q.6	Negativo	Amarelo	—
8Q.9	Positivo	Amarelo + Preto	—
9Q.7	Positivo	Vermelho + Amarelo	—
9Q.12	Positivo	Vermelho + Amarelo	—
9Q.13	Positivo	Vermelho + Amarelo + Preto	—
9Q.15	Negativo	Amarelo	—

10Q.10	Positivo	Vermelho	—
10Q.12	Positivo	Amarelo	—
10Q.13	Positivo	Amarelo + Gás	—
10Q.15	Negativo	Amarelo	—
17Q.2	Positivo	Amarelo	+
17Q.4	Positivo	Vermelho	+
17Q.5	Positivo	Amarelo	—
18Q.6	Positivo	Amarelo + Preto	+
19Q.1	Positivo	Amarelo	+
19Q.2	Positivo	Amarelo	+
19Q.3	Positivo	Amarelo	—
19Q.6	Negativo	Vermelho	—
19Q.8	Negativo	Amarelo	—
22Q.1	Positivo	Amarelo	—
22Q.2	Positivo	Amarelo	+
22Q.3	Positivo	Amarelo	+
23Q.2	Positivo	Amarelo	—
23Q.4	Positivo	Amarelo	—
23Q.5	Positivo	Amarelo	—
24Q.2	Positivo	Vermelho + Amarelo + Preto	+
24Q.3	Positivo	Amarelo	—
24Q.5	Positivo	Vermelho + Amarelo	+
30Q.2	Positivo	Amarelo	—
30Q.3	Positivo	Amarelo	—
30Q.4	Positivo	Amarelo	—
30Q.7	Positivo	Amarelo	—
31Q.2	Positivo	Vermelho	—
31Q.3	Positivo	Vermelho	—
32Q.4	Positivo	Vermelho + Amarelo	—
32Q.5	Positivo	Vermelho + Amarelo	+
34Q.1	Negativo	Vermelho	—
34Q.2	Positivo	Amarelo	—

34Q.3	Positivo	Vermelho	–
35Q.1	Positivo	Vermelho	+
35Q.2	Positivo	Vermelho	–
35Q.4	Positivo	Vermelho	–
36Q.1	Positivo	Amarelo + Gás	–
36Q.2	Positivo	Vermelho + Amarelo	–
36Q.4	Positivo	Amarelo	–
37Q.3	Positivo	Vermelho	–
37Q.5	Positivo	Amarelo + Preto	–
40Q.4	Positivo	Amarelo + Preto	–
40Q.6	Positivo	Vermelho + Amarelo	–
40Q.8	Positivo	Vermelho + Amarelo	–

+: presença do amplicon para o gênero *Salmonella*.

A Figura 3 apresenta o amplicon de 429 pb (pares de bases) característico do gênero *Salmonella* sp em dois isolados.

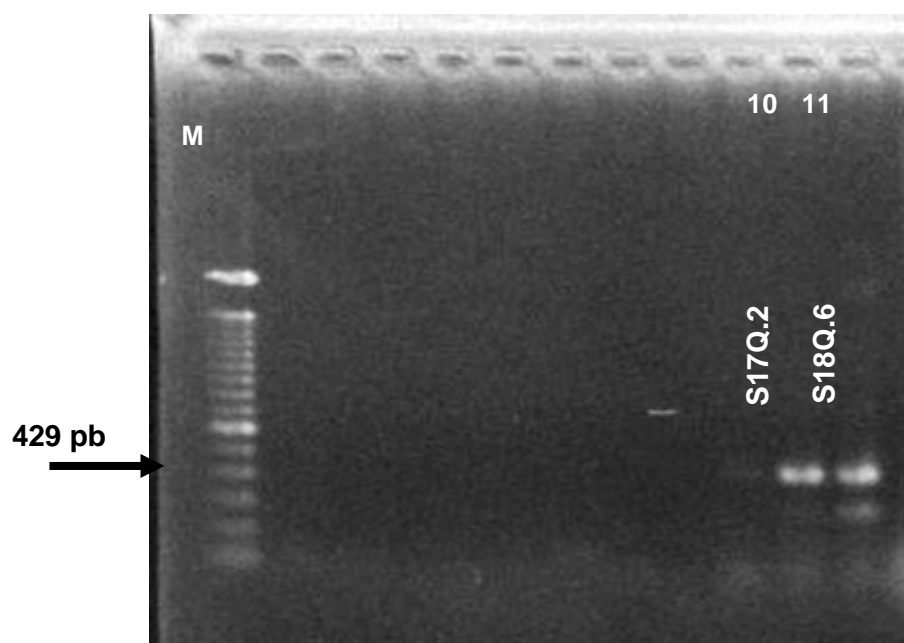


Figura 3. Imagem em Gel de Agarose 1,5%. Bandas compatíveis com gene que identifica o gênero *Salmonella* spp (429 pares de bases) (seta). M – marcador de peso molecular (100pb); canaletas 10 e 11 correspondem aos isolados S17Q.2 e S18Q.6 – amostras confirmadas.

OKURA (2010) em trabalhos semelhantes, constatou a presença de *E.coli* em amostras de queijos sendo 70% para queijos produzidos com leite cru, 61,4% queijo temperado e 30% elaborados com leite pasteurizado, o que demonstra condições higiênico-sanitárias insatisfatórias para os produtos testados, com possibilidade de apresentar riscos à saúde pública, em razão da sua larga comercialização.

A presença de *E. coli* em um alimento pode indicar contaminação microbiana de origem fecal, por ser a *E. coli* uma enterobactéria, todavia, algumas linhagens são comprovadamente patogênicas para o homem e animais (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001). Araujo et al (2001) relatam que esses micro-organismos são capazes de causar infecções e/ou intoxicações alimentares podendo provocar febre, calafrios, cólica abdominal, diarreia aquosa profusa, vômito, desidratação e choque.

Muitas pesquisas preocupavam-se apenas com a presença de coliformes em queijos, entretanto, devido à ocorrência de surtos alimentares causados por *E. coli* enteropatogênica (EPEC), tem-se aumentado significativamente a preocupação com a quantidade de *E. coli* nestas amostras.

Frank e Marth (1978) mencionaram que *E. coli* enteropatogênica possui aptidão em crescer durante a produção do queijo macio e semi-macio. Silva et al. (2001) ao analisar 208 estirpes de *E. coli* em leite pasteurizado no Rio de Janeiro, obtiveram 22,1% de EPEC. Assim como, Nascimento et al. (1988) isolaram 9,8% de EPEC em 605 estirpes de *E. coli* isoladas de 51 amostras de queijo tipo Minas Frescal, na cidade de Ouro Preto.

Martins et al. (2003) ressaltaram que estudos relacionados a fatores de virulência, sintomatologia e epidemiologia demonstram que os sorogrupos EPEC são heterogêneos e algumas cepas apresentam expressivo potencial patogênico, podendo corresponder às classes EHEC, EaggEC e DAEC. Portanto, a cepa de EPEC em alimentos deve ser considerada como um alerta em nível de Saúde Pública, inclusive no aspecto de doença emergente. Desta forma, a quantidade de estirpes isoladas neste estudo foi considerada, no mínimo, preocupante; além do que EPEC se constitui num dos mais importantes agentes etiológicos de infecções intestinais agudas, particularmente na população de menor poder econômico.

MACHADO et al (2010), por sua vez, confirmou a presença de *Salmonella* em 19,5% de amostras de queijo Coalho analisadas, enquanto que BORGES et al. (2003) detectou *Salmonella* spp em 35% das amostras de queijos, classificando os

queijos como produtos impróprios para o consumo humano. ISEPON et al. (2003), também verificaram a presença de *Salmonella* spp em amostras de queijos.

A constatação dessa realidade mostra que para a maioria dos queijos fabricados a partir de leite cru, a presença de bactérias os classifica em condições inadequadas de consumo. Mediante esse quadro, faz-se necessário uma atuação mais incisiva dos órgãos de fiscalização sanitária, na finalidade de aplicar o que é preconizado na regulamentação pertinente ao Serviço de Inspeção Federal, como a produção desse tipo de queijo a partir de leite pasteurizado, além das exigências de condições adequadas à linha de produção (BRASIL, 1996). Essas práticas são simples e, quando corretamente implementadas, permite a diminuição da carga microbiana inicial com consequente eliminação de patógenos (CAMPOS et al., 2006).

PEREIRA et al. (1999) evidenciaram ausência de *Salmonella* spp em todas as amostras de queijo Minas Frescal, no entanto, verificou-se que essas amostras apresentaram elevada contagem de coliformes fecais.

Os resultados obtidos pelo teste de difusão em discos de antibiótico foram analisados com o auxílio de uma régua milimétrica que indicaram medidas de inibição pela análise do halo (Figura 4).

O perfil de resistência da *E. coli* a antimicrobianos revelaram que todos (100%) dos isolados testados apresentaram-se sensíveis à cloranfenicol (CLO), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), amicacina (AMI), norfloxacin (NOR), imipenem (IPM) e ácido nalidíxico (NAL), contudo, a eritromicina (ERI) obteve 58,82% dos isolados intermediários e uma amostra (6QI.8) resistente. Apenas a amostra 41Q.1 apresentou resistência a mais de um antibiótico (Tabela 3).

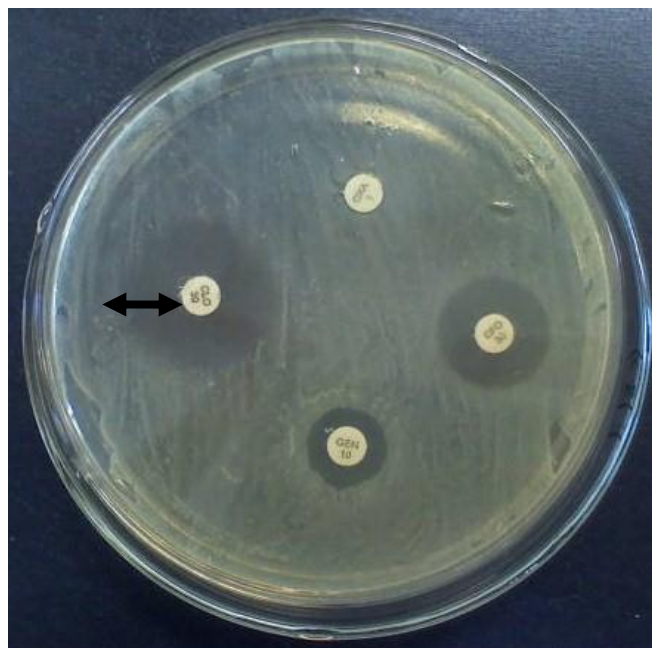


Figura 4. Teste de difusão em discos de antibiótico para *Salmonella sp.* A seta indica halo de inibição formado.

Tabela 3. Perfil de Susceptibilidade de *Escherichia coli* a antimicrobianos de uso clínico

Queijo	isolado	CLO	GEN	ERI	CIP	TET	AMI	NOR	IPM	AMP	AMC	NAL
6QI	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6QI	5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6QI	8	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S
6Q	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6Q	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6Q	3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
39Q	1	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
39Q	3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
39Q	4	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
40Q	1	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
40Q	9	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
40Q	11	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
41Q	1	S	S	I	S	R	S	S	S	S	R	S
41Q	4	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S
42Q	1	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
42Q	6	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
42Q	7	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S

Em trabalho realizado por Okura (2010), as cepas de *E.coli* submetidas ao teste de difusão em disco de antibiótico mostraram-se bastante sensíveis (100%) aos antimicrobianos do grupo das quinonas (ácidos nalidíxico, oxolínico, norfloxacino e a ciprofloxacina) (TRABULSI et al., 2005). Resultados semelhantes foram obtidos

por Franco et al. (1985) ao isolarem cepas enteropatogênicas em amostras de alimentos de origem animal observaram que algumas foram resistentes a um ou mais antibióticos, sendo a maioria sensível aos antimicrobianos estudados. De acordo com Koneman et al. (2001) a *E. coli* é suscetível à maioria dos antibióticos, comprovando assim os resultados obtidos no presente estudo.

Os resultados deste trabalho diferem dos obtidos em Goiás por Campos et al. (2006) na qual avaliaram queijo tipo Minas Frescal e obtiveram micro-organismos resistentes a ampicilina. No entanto, foram compatíveis com Paneto et al. (2007) que avaliaram queijo Minas produzido com leite não pasteurizado da região Centro Oeste obtendo *E. coli* resistentes a tetraciclina (31%) e Okura (2010), com 37,8% das cepas resistentes a tetraciclina.

Existem registros na literatura de *E. coli* proveniente de amostras alimentícias é habitualmente sensível à maioria dos antimicrobianos testados. Todavia, dados mais recentes revelam o aparecimento de cepas resistentes a diversos antimicrobianos, tais como gentamicina, estreptomicina, ampicilina, tetraciclina, amicacina e sulfonamidas, inclusive com a ocorrência de cepas multirresistentes a dois ou mais desses antimicrobianos de importância terapêutica (RIBEIRO et al., 2009; RANGEL; MARIN, 2009; STELLA et al., 2008; MOTA et al., 2005).

Coliformes antibiótico-resistentes podem ser importantes não só por sua potencialidade patogênica como por transferirem resistência para outras bactérias patogênicas, podendo se converter em um problema de Saúde Pública (LÁZARO, et al., 1999).

Em relação ao perfil de resistência de *Salmonella* a antimicrobianos, todos os isolados testados apresentaram-se sensíveis à amicacina (AMI) e norfloxacina (NOR), contudo, 34,04% apresentaram resistência a um ou dois antibióticos testados, enquanto que os isolados S18Q.6, S34Q.3 e S36Q.1 foram multirresistentes (resistência a 3 ou mais antibióticos) (Tabela 4).

Cortez et al (2006) analisou a resistência de 29 cepas de *Salmonella* frente a 12 antimicrobianos na qual constatou que 55,17% dos isolados apresentaram-se resistentes a amoxicilina (AMC), 93,10% a amicacina (AMI), 75,86% a ampicilina (AMP), 27,60% a cloranfenicol (CLO), 3,45% a gentamicina (GEN) e 72,43% a tetraciclina (TET). BOKANY JUNIOR et al (1990), por sua vez, testaram a resistência de *Salmonella* frente a ação da ampicilina, gentamicina, tetraciclina e cloranfenicol e observaram que 37 (67,3%) das 55 cepas testadas foram resistentes a um ou mais princípio.

Spricigo *et al* (2008) avaliou o perfil de resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isoladas de linguiça frescal e obteve maiores resistências a sulfonamida e tetraciclina (81, 25%), ampicilina (50%), amoxicilina (18,75%), contudo, nenhum sorovar apresentou resistência a amicacina (AMI), resultado semelhante ao adquirido no trabalho. Este pesquisador também observou multirresistência em 8 de 16 amostras analisadas.

Vários autores têm associado o aumento da resistência bacteriana a antimicrobianos com a administração excessiva a animais criados para a produção de alimentos (CRUCHAGA et al., 2001; SCHWARZ et al., 2001). Outros autores (FEDORKA- CRAY et al., 1999; ISAACSON et al., 2001) observaram, ainda, que os maiores índices de resistência ocorriam contra antimicrobianos disponíveis há mais tempo no mercado e que eram comumente utilizados na terapêutica. Dessa forma, o alto número de amostras resistentes à eritromicina, encontrado no presente estudo, poderia ser explicado pelo seu uso frequente há vários anos.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitiram a confirmação da presença de *Salmonella* e *Escherichia coli* enteropatogênica, pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase, nos queijos tipo Minas Frescal produzidos e comercializados na cidade de Londrina- PR, constatando que estes encontram-se impróprios para o consumo, uma vez que constituem risco à saúde do consumidor.

Algumas cepas analisadas apresentaram resistência há pelo menos um antimicrobiano testado, enquanto que outras apresentaram-se sensíveis ou Intermediárias.

Para se obter um alimento de qualidade é necessário que a matéria-prima, o processamento e o fornecimento do produto seja feita cuidadosamente, a fim de evitar contaminações de qualquer tipo, garantindo a qualidade do queijo e de alimentos diferenciados, seja ele artesanal ou industrializado.

A preocupação em relação à segurança alimentar deve atingir os consumidores e os órgãos de saúde pública responsáveis pela garantia do fornecimento de alimentos seguros à população. As condições de produção e comércio deste alimento como o não uso de leite pasteurizado, em alguns casos, instalações precárias, disponibilidade de água corrente deficiente, a temperatura de armazenamento do alimento e higiene pessoal dos manipuladores, podem ser consideradas um risco à saúde pública.

Com base nessas observações, a reversão deste quadro depende principalmente da adoção de medidas públicas, que venham contribuir para o cumprimento da legislação pertinente e para a realização de trabalhos educativos, que auxiliarão na capacitação dos comerciantes ambulantes, quanto às condições higiênico-sanitárias, de modo a minimizar os erros e riscos de contaminação.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P.M.P. de. & FRANCO, R.M. **Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas Frescal com pesquisa de patógenos importantes à Saúde Pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* e Coliformes Fecais.** São Paulo: Rev. Hig. Alimentar. v.17, n.111, p. 79-85. ago, 2003.

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 Agricola. v.53, n. 1, p. 159- 163, jan/abr. 1996.

ARAÚJO, W.N.de; SILVA, M.H.; MARTINEZ, T.C.N.; SILVA, A.V.A.F.; SILVEIRA, V.F.da.; BARROS, S.L.B. **Determinação do nível de contaminação por coliformes totais no queijo Minas comercializado na Região Metropolitana de Salvador – Bahia.** Rev. Bras. Saúde Prod. An. v. 2, n.1, p. 5-9 , 2001.

AZNAR, R.; ALARÓN, B. **PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity.** Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 95, n. 5, p. 958-966, Nov., 2003.

BENNET, A.R.; GREENWOOD, D.; TENNANT, C. ; BANKS, J.G.; BETTS, R.P. **Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR.** Letters in Applied Microbiology. V.26. p.437-441, 1998.

BIER, O. **Microbiologia e imunologia.** Melhoramentos. São Paulo: 3.ed, p.1234, 1990.

BORGES, M.de.F.; FEITOSA, T.; NASSU, R.T.; MUNIZ, C.R.; AZEVEDO, E.H.F.de.; FIGUEIREDO, E.A.T.de. **Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no estado do Ceará, Brasil.** B. Ceppa, Curitiba, v.21, n.1, p.31-40, jan./jun. 2003

BRAMLEY, A. J.; MCKINNOM, C. H. Dairy microbiology: **the microbiology of milk.** 2 ed. London/New York: Elsevier Science Ltda, p.163-207, 1990.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento.** Portaria nº146 de 07 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria no 352 , de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico para Fixação de Identidade e qualidade do queijo Minas Frescal. Brasília: MA, 1997.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Resolução RDC 12 de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília – DF, n.7 – E, seção 1, p. 45-53, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL, Instrução Normativa Nº 51, DE 18 DE SETEMBRO DE 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o

Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, 20 set., 2002, Seção 1, Página 13.

_____. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. Brasília, 1974.

BREYER, C.A. **Utilização de técnicas moleculares para caracterização desorotipos de *salmonella* originários de abatedouros e dacadeia produtiva de aves da região de Videira/SC**. Trabalho de Conclusão de Curso. Videira: Universidade do Oeste de Santa Catarina, p. 45, 2009.

BHAGWAT, A.A. **Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR**. Food Microbiol. v.84, p.217-224, 2003.

BUSH, U.; NITSCHKO, H. **Methods for the differentiation of microorganisms**. J. Chromatography, Amsterdam, v. 722, p. 263-278, 1999.

CÂMARA, S. A. V.; AMARAL, G. B.; MULLER, M. T.; SILVEIRA, K. C. S.; ALMEIDA, T. N.; MEDEIRO, C. F. **Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas Frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2000**. Revista Higiene Alimentar. v. 16, n .101, p. 32-36. 2002.

CAMPOS, M.R.J.H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; VIEIRA, C.A.da. S.; JAYME, L.B., SANTOS, P.P. SERAFINI, A.B. **Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil**. Ciênc. Rural, Santa Maria, v.36, n.4, p. 1221-1227, jul./ago, 2006.

CORTEZ, A.L.L. CARVALHO, A.C.; IKUNO, A.A.; BURGER, K.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. **Resistência Antimicrobiana de Cepas de *Salmonella* spp isoladas de Abatedouros de Aves**. Instituto Biológico, Centro de Sanidade Animal, São Paulo, SP, Brasil. v.73, n.2, p.157-163, abr./jun., 2006.

CRUCHAGA, S.; ECHEITA, A.; ALADUEÑA, A. et al. **Antimicrobial resistance in *Salmonellae* from humans, food and animals in Spain in 1998**. *J. Antim. Chemisth.*, v.47, p.315-321, 2001.

CHIU, T.T.; LAM, T.H; HEDLEY, A. J. **A randomized controlled trial on the efficacy of exercise for patients with chronic neck pain**. Spine 2005.

DIAS, M. T. **Caracterização Genotópica e Avaliação da Susceptibilidade Antimicrobiana de Cepas Patogênicas de *Escherichia coli* isoladas de queijo minas frescal**. Fundação Osvaldo Cruz-Rio de Janeiro, 2011.

EMPRESA DE ASSISTENCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL. **Queijos tradicionais de Minas com mais qualidade**. Revista da EMATER – MG, Muzambinho, v. 22, n. 80, p. 8-9, ago. 2004.

FAVRIN, S.J., JASSIM, S.A., GRIFFITHS, M.W. **Development and Optimization of a novel immunomagnetic separation – bacteriophage assay for detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, n.7, p.217-224. 2001.

FEITOSA, T.; BORGES, M.de.F., NASSU, R.T., AZEVEDO, E.H.I.de., MUNIZ, C.R. **Pesquisa de *Salmonella sp*, *Listeria sp* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte.** *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, v. 23. suppl., p. 162-165. dec, 2003.

FEDORKA-CRAY, P.J.; BAHNSON, P.B.; LADELY, S.R. **Antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* isolates collected from slaughter age pigs.** In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 3., 1999, Washington. *Proceedings...Washington*, p.245-247, 1999.

FRANCO, B. D. G. M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

FRANK, J.F. & MARTH, E.H. **Survey of soft and semisoft cheese for presence of fecal coliforms and serotypes of *Enteropathogenics Escherichia coli*.** *J. Food Protect.* v.41, n.3, p.198-200, mar.1978.

FRANCO, B.D.G.M.; GUTH, B.E.; TRABULSI, L.R. **Isolamento e características de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de alimentos.** *Rev. de Microbiol.:* Rio de Janeiro, p. 7-53, 1985.

FREITAS, A.C. et al. **Ocurrence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro, Brasil.** *Journal of Food Protection* v.5, p. 62-65. 1993.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção.** São Paulo: Fonte, 1999. 176p.

GALES, A.C.; PIGNATARI, A.C.; JONES, R.N.; BARETTA, M.; SADER, H.S. **Avaliação da atividade *in vitro* dos novos antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, cefalosporinas e carbapenens contra 569 amostras clínicas de bactérias gram-negativas.** São Paulo: *Rev. Assoc. Med. Bras.* v. 43, n.2, p.137-144. apr./jun, 1997.

GRANDI, A.Z; ROSSI.D.A; **Qualidade Microbiológica do queijo Minas Frescal Comercializado na Cidade de Uberlândia- MG.** Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2005.

HOLT, J.G. **Bergey's: Manual of determinative bacteriology.** 9.ed. Baltimore: Williams & Williams, 1994. p.186-187.

HOORFAR, J.; BAGGESEN, D.L; PORTING, P.H. **A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates.** *Journal of microbiological Methods.* V.35. p. 07-84. 1999.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria Nº 818, de 12 de dezembro de 2006**. Regulamento Técnico de Produção do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 2006. p. 4.

_____. **Portaria nº 523, de 3 de julho de 2002**. Dispõe sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e Boas Práticas na Manipulação e Fabricação do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 2002. p. 14.

ISAACSON, R.E.; QIAO, B.; BARBER, D. A. et al. **Antibiotic resistance patterns and genotypes of *Salmonellae* within swine production systems and the relationship to on farm use of antibiotics**. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 4., 2001, Leipzig. *Proceedings...*Leipzig, 2001. p.396-398.

ISEPON, J.dos.S.; SANTOS, P.A. dos; SILVA, M.A.P.da. **Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados na cidade de Ilha Solteira, SP**. São Paulo: Rev. Higiene Alimentar, v. 17, n.106, p. 89-94, mar. 2003.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia médica**, 20 ed., p.99-129, 1998.

KATTOM, T.J.; NOLAN, L.K.; BROWN, J. **Invasion of caco-2 ellsmurium (Copenhagen) isolates from healthy and sick chickens**. Avian Diseases. v.39, p.867-872, 1995.

KEER, D.S.; CAMPBELL, L.W.; THIBAUT, O.; LANDFIELD, P.W. **Hippocampal glucocorticoid receptor activation enhances voltage-dependent calcium conductance: relevance to brain aging**, 1992.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL JR.; V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico microbiológico** . Texto e atlas colorido. 2º ed., São Paulo, Editora Panamericana,61-132, 1997.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JUNIOR, W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

LÁZARO, N.dos.S.; FARIAS, R.de.S.; RODRIGUES, D.dos.P.; HOFER, E. **Enterobacteriaceae oriundas de fonte humana e animal: produção de enterotoxina termoestável e nível de resistência a antimicrobianos**. São Paulo: Rev. Hig. Alimentar. v. 12, n. 64, p. 49 – 55. set. 1999.

LANDGRAF, Mariza. Microrganismos Indicadores. In: FRANCO, Bernadette D. G. M., LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 27 – 31.

LOGUERCIO, A.P. & ALEIXO, J.A.G. **Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente**. Ciênc. Rural. Santa Maria v. 31, n.6, p. 1063-1067, 2001.

MALORNY, B., et al. **Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens.** Int. J. Food Microbiol., 2003.

MARTINS, S.C.; LIMA, J.R.de.; ALMADA, J.da.S.; PREIRA, A.J.B. “**Screening**” de linhagens de *Escherichia coli* multiresistentes a antibióticos em alimentos de origem animal no estado do Ceará, Brasil. Rev. Hig. Alimentar, São Paulo, v.17, n.104/105, p.71-76, jan./fev., 2003.

MACHADO, T.F.; BRUNO, L. M.; BORGES, M.F.; OLIVEIRA, F.E.M.; PORTO, B.C.; SOUSA, C.T. **Isolamento e Caracterização bioquímica de *Salmonella spp* em amostras de queijo coalho.** Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, Salvador, 2010.

MACÊDO, N.R.; MENEZES, C.P.L.; LAGE, A.P. et al. **Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarréicos.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.59, p.1117-1123, 2007.

MENEZES, E.A.; MACEDO, F.V.V.; CUNHA, F.A.; ANDRADE, M.do S.de.S.; ROCHA, M.V.A.de.P. **Perfil de infecção e resistência aos antimicrobianos de bacilos Gram negativos não fermentadores isolados no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edílson Gurgel, Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza – CE.** RBAC v. 36, n.4, p. 209 – 212, 2004.

MOTA, R.A.; SILVA, K.P.C. da; FREITAS, M.F.L.de; SILVA, L.B.G. **Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana.** Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. São Paulo, v. 42, n.6, p.465-470, 2005.

MOELLERING Jr., R. C. **Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen.** Clin. Infect. Dis., 14: 1173 – 1178, 1992.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.** Methods Enzymol, 1987.

NATARO, J.P.; KAPER, J. B. **Diarrheagenic *Escherichia coli*.** Clin. Microbiol. Rev., v. 11, p. 142-201, 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS.), **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically,** 5a ed. Wayne, Pa., M2-A8. v.23, n.1, 2003.

NASCIMENTO, D.do; SABIONI, J.G.; PIMENTA, N. **Freqüência de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) e enteroinvasiva (EIEC) em queijo tipo Minas Frescal da cidade de Ouro Preto, MG.** Rev. Microb. São Paulo: v.19, n.3, p.258-261, 1988.

OLIVEIRA, C.A.F.; MORENO, J.F.G.; MESTIERI, L. GERMANO, P. **Características físico-químicas e microbiológicas de queijo Minas Frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do Estado de São Paulo.** São Paulo: Rev. Hig. Alimentar. v. 12, n.55, p.31-35, 1998.

OKURA, M.H. **Avaliação Microbiológica de Queijos Tipo Minas Frescal Comercializados na Região do Triângulo Mineiro.** Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. p.146. 2010.

PANETO, B.R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; MACEDO, C.; SANTO, E.; MARIN, J.M. **Ocorrência de *Escherichia coli* toxigênica em queijo de Minas Frescal no Brasil.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. V.59, n.2, Belo Horizonte, p.508-512, apr, 2007.

PAN, T. M.; LIU, Y. **Identification of *Salmonella enteritidis* isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction.** J. Microbiol Immunol. Infect. 2002, 35:147-151.

PEREIRA, M. L; GASTELOIS, M. C. A; BASTOS, E. M. A. P.; CAIAFFA, W. T; FALEIRO, E. S. C. **Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* SP. Em queijo Minas.** Arq. Brás. Med. Vet. Zootecnia. V.51, n. 5, p. 427- 431, 1999.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMUHL, J.; BRENNER, F.W.; GBEE SLING, L.L. Supplement 2000 (nº44) to the kauffman-white scheme. **Research in Microbiology.**v. 152. P. 907-909. 2001.

PORTER, S.B.; CURTISS, R. **Effect of inv Mutations on *Salmonella* Virulence and Colonization** in – Day – Old White Leghorn Chicks. Avian Diseases. v.41, p.45-47, 1997.

RANGEL, P.M. & MARIN, J.M. **Resistência a agentes antimicrobianos em cepas brasileiras de *Escherichia coli* codificadora de shiga toxina isolada de vaca com mastite.** Jaboticabal: Ars Veterinária, v.25, n.1, p.18-23, 2009.

RIBEIRO, M.G.; GERALDO, J.S.; LANGONI, H.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; FERMANDNES, M.C. **Microrganismos patogênicos celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico.** Pesq. Vet. Bras., v. 29, n.1, Rio de Janeiro, jan, p.52-58, 2009.

RIVERA, I.G.; CHOWDHURY, M.A.R., HUQ, A., JACOBS, D., MARTIUS, M.T. & COLWELLI, R.R. 1995. **Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and 101 the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139 and non-O1 strains.** Appl. Environ. Microbiol. v.61. p. 2898-2904.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. **Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

RÚGELES, L. C. et al. **Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia.** International Journal of Food Microbiology, v. 138, n.3, p. 282-286, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual,** 2. Ed.. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1, 1989.

SILVA, Z.N.da.; CUNHA, A.S.da.; LINS, M.C.; CARNEIRO, L.de.A.M.; ALMEIDA, A.C.de.F.S.; QUEIROZ, M.L.P. **Isolamento e identificação sorológica de *Escherichia coli* enteropatogênica em leite pasteurizado**. Rev. Saúd. Públic. São Paulo, v.35, n.4, p. 375-379, 2001.

SILVA, C. A. B; FERNANDES, A. R. Projetos de empreendimentos agroindustriais. Viçosa: Editora UFV, v. 1. Universidade Federal de Viçosa, 2005.

SILVA, C. A. M.; LEITÃO, M. F. F. **Influência da temperatura de armazenamento na proliferação microbiana e no tempo de vida útil de queijo tipo “Minas Frescal”**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 4, 1980, Rio de Janeiro. Programa Oficial, Resumos... Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. p.186, 1980.

SILVA, S.; SOUZA, C. **Avaliação microbiológica de queijo tipo minas frescal comercializado na cidade de Belém - Pará**. Laboratório Central do Estado do Pará-Centro Tecnológico da Universidade Federal do Pará, 2006.

SILVA, N.da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.dos; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552p.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. **Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance**. Vet. Res., v.32, p.201-225, 2001.

SPRICIGO, D.A.; MATSUMOTO, S.R.; ESPÍNDOLA, M.L; VAZ, E.K; FERRAZ, S.M. **Prevalência e perfil de resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isoladas de linguiças suínas tipo frescal em Lages, SC**. Centro de Ciências Agroveterinárias. v.60, n.2, p.517-520, 2008.

SPHIGEL, N.Y. et al. **Mammary pathogenic *Escherichia coli***. Current opinion in microbiology, v. 11, n. 1. p. 60-65, 2008.

STELLA, A.E.; RIGOBELLO, E.C.; OLIVEIRA, A.C.de; MALUTA, R.P.; MARIN, J.M. e ÁVILA, F.A.de. **Ocorrência e sensibilidade microbiana de linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de propriedades leiteiras na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil**. Vet. e Zootec., v. 15, n.1, abr.; p.66-74, 2008.

TAVARES, W. **Problem Gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 33 (3), 1 – 35, 2000.

TORNIEPORTH, N. G. et al. **Differentiation of pathogenic *E. coli* strains in Brazilian children by PCR**. Journal of Clinical Microbiology, v. 33, n. 4, p. 1371, 1995.

Todar K. **Bacterial structure in relationship to pathogenicity: The importance of the bacterial surface**. http://www.textbookof_bacteriology.net University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. p. 1-4, 2008.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia** 4^a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005, 718p.

VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium for the microbiological examination of foods**. 3ed. Washington: American Public Health Association, p. 1219, 1992.

VUGIA, D.J., SAMUEL, M., FARLEY, M.M., MARCUS, R., SHIFERAW, B., SHALLOW, S., SMITH, K., ANGULO, F.J. The Emerging Infections Program 2004.

Van den BOGAARD, A. E., N. BRUINSMA & E. E. STOBBERING. **The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands**. J. Antimicrob. Chemother. 46: 146 -147. 2000.

LOGUEIRO, ANDREA PINTO; ALEIXO, JOSE ANTÔNIO GUIMARÃES. **Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente**. Ciência Rural, São Paulo, v. 31, n. 6, 2001.