

**MÁRCIA MENEZES NUNES**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS PRONTOS PARA O  
CONSUMO NO DISTRITO FEDERAL E AVALIAÇÃO DE RISCO QUANTITATIVO  
DA EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO BRASILEIRA A *STAPHYLOCOCCUS*  
*AUREUS* PELO CONSUMO DE QUEIJO MINAS FRESCAL**

**BRASÍLIA, 2013**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**MÁRCIA MENEZES NUNES**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS PRONTOS PARA O  
CONSUMO NO DISTRITO FEDERAL E AVALIAÇÃO DE RISCO QUANTITATIVO  
DA EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO BRASILEIRA A *STAPHYLOCOCCUS  
AUREUS* PELO CONSUMO DE QUEIJO MINAS FRESCAL**

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutora em Ciências da  
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eloisa Dutra Caldas.

**BRASÍLIA  
2013**

**MÁRCIA MENEZES NUNES**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS PRONTOS PARA O  
CONSUMO NO DISTRITO FEDERAL E AVALIAÇÃO DE RISCO QUANTITATIVO  
DA EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO BRASILEIRA A *STAPHYLOCOCCUS  
AUREUS* PELO CONSUMO DE QUEIJO MINAS FRESCAL**

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutora em Ciências da  
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em: 16 de agosto de 2013.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eloisa Dutra Caldas (FCS/UnB)**  
**(Presidente)**

---

**Prof. Dr. Anderson Souza Sant'Ana (UNICAMP)**  
**(Membro Efetivo)**

---

**Prof. Dr. Wilmer Edgard Luera Pena (UFV)**  
**(Membro Efetivo)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Aguiar Ferreira (UnB)**  
**(Membro Efetivo)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Pérola Oliveira Magalhães Dias Batista (UnB)**  
**(Membro Efetivo)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Yolanda Mercedes Silva Camps de Oliveira (UnB)**  
**(Membro Suplente)**

*À minha mãe, Martha, e ao meu filho, Liam*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por fazer-me acreditar na força espiritual que há em mim.

À professora Eloisa, pela oportunidade de realizar o doutorado na Universidade de Brasília (UnB): pelos ensinamentos e orientação. Muito Obrigada!

À minha mãe, pelo incentivo intelectual, sempre, ao custo de minha ausência, mesmo naqueles momentos que eu deveria ter estado. Obrigada pelas histórias de vida que me inspiraram nos momentos difíceis, pelos telefonemas, pela paciência, pelo amor, por existir. Obrigada!

Ao meu filho Liam, pela sua paciência nos diversos momentos que não pude lhe dar atenção.

À minha família, meu pai e irmãos, pelo incentivo moral e pelo amor.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF), pela autorização do estágio, em especial, aos gerentes da Gerência de Controle de Qualidade de Produtos e Ambientes (GCQPA), Sônia e Silvio, que me possibilitaram ocupar espaço reduzido na gerência para que eu pudesse analisar e transcrever os laudos.

Aos servidores do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiente (LMAM), Pedro, Raquel, Laila e Cláudia, por gastarem seu tempo dirimindo minhas dúvidas acerca dos dados reportados nos laudos.

À Rosa Maria S. Mossri, chefe do Núcleo de Agravos e Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (NATHA), pela disponibilidade dos dados de surtos alimentares no Distrito Federal, pelos esclarecimentos e ajuda na análise, com atenção e carinho.

À Lígia Lindner Schreiner, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pelos dados estaduais, gentilmente cedidos.

Ao professor Dr. Vitor S. Picão Gonçalves e sua aluna de doutorado, Ana Lourdes Arrais de Alencar Mota, do laboratório de Epidemiologia e Planejamento (EpiPlan) da Faculdade de Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), pela grande ajuda na análise de dados usando o STATA.

Ao Dr. Marcos Huber Mendes, estatístico da Palisade®, pela orientação extra ao treinamento que recebi para o uso das ferramentas do @risk, além do bom humor.

Aos colegas do laboratório LABTOX, em especial, a Andréia N. de O. Jardim, minha companheira nesses anos.

Aos amigos Nancy Pereira de Novais e Alessandro Benevenuto, pela amizade, parceria e ajudas técnicas.

A todos que estiveram comigo nesta jornada, obrigada!

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 –	Número de surtos por agente etiológico entre 2000 e 2011 reportados pelo Ministério da Saúde	8
Figura 1.2 –	Número de surtos no Brasil envolvendo <i>S. aureus</i> , período 2000-2011	9
Figura 1.3 –	Parâmetros primários à temperatura constante	22
Figura 1.4 –	Etapas da avaliação de risco	26
Figura 3.1 –	Histograma do nível de contaminação de amostras analisadas para SCP (N=338) - inserido, a distribuição das amostras positivas (N=65)	67
Figura 3.2 –	Histograma das temperaturas registradas do refrigerador doméstico do Labtox (N=734)	68
Figura 3.3 –	Histograma dos registros de pH das amostras de queijo tipo Minas frescal (N=76)	68
Figura 3.4 –	Histograma do %NaCl das amostras de queijo tipo Minas frescal (N=40)	69
Figura 3.5 –	Histograma da porção (gramas) de queijo tipo Minas frescal consumida pela população de adolescentes	70
Figura 3.6 –	Histograma da porção (gramas) de queijo tipo Minas frescal consumida pela população de adultos	71
Figura 3.7 –	Histograma da porção (gramas) de queijo tipo Minas frescal consumida pela população de idosos	71
Figura 3.8 –	<i>Output</i> do ComBase nas temperaturas de 7,5; 8; 10 e 17°C, pH 5,5 e 1,14%NaCl	74
Figura 3.9 –	Equação de crescimento (EC1) em função de temperatura de armazenamento, pH 5,5 e 1,14%NaCl	77
Figura 3.10 –	Equação de duração de fase lag (Elag1) em função de temperatura de armazenamento, pH, 5,5 e 1,14%NaCl	77
Figura 3.11 –	Ilustração do <i>output</i> do PMP na temperatura de 17°C, pH, 6,5 e 1,1%NaCl	78

Figura 3.12 – Equação de crescimento (EC2) em função de temperatura de armazenamento, pH, 5,5 e 1,14%NaCl, no modelo PMP	80
Figura 3.13 – Equação de duração de fase (Elag2) em função de temperatura de armazenamento, pH, 5,5 e 1,1%NaCl	81
Figura 3.14 – Eventos de ingestão entre 0 e 283,2g, para adolescentes no modelo I	84
Figura 3.15– Gráfico de tornado do efeito do <i>input</i> no <i>output</i> da Dose de exposição a SEA por adolescentes pelo consumo de queijo tipo Minas frescal, de acordo com modelo 1 (ComBase).	85

## LISTA DE QUADRO

Quadro 1.1 - Combinação patógeno/alimento de avaliação de risco microbiológico	31
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 -	Surtos estafilocócicos no Brasil	13
Tabela 1.2 -	Menor dose de enterotoxina estafilocócica (SE) que causou infecção	29
Tabela 3.1 -	Variáveis do modelo de exposição à enterotoxina estafilocócica pelo consumo de queijo tipo Minas frescal	64
Tabela 3.2 -	Número de amostras de queijo tipo Minas frescal analisadas por Estado, período 2010-2012	65
Tabela 3.3 -	Parâmetros analisados em queijo tipo Minas frescal pelos LACENs.	66
Tabela 3.4 -	Informação sobre os valores das porções de queijo tipo Minas frescal para cada faixa etária	70
Tabela 3.5 -	Moda das temperaturas no Distrito Federal registrada pelo Instituto Nacional de Meteorologia	72
Tabela 3.6 -	Impacto das variáveis independentes sobre a variável dependente na etapa de treinamento	73
Tabela 3.7 -	Taxa de crescimento ( $\mu$ ), em log UFC/g/hora de <i>S. aureus</i> obtidas do ComBase variando o estado fisiológico (EF), % NaCl e pH - população inicial de 3 logUFC/g	75
Tabela 3.8 -	Fase lag ( $\lambda$ ) em horas para <i>S. aureus</i> obtidas do ComBase variando o estado fisiológico (EF), %NaCl e pH - população inicial de 3 logUFC/g	76
Tabela 3.9 -	Taxa de crescimento ( $\mu$ ), e fase lag( $\lambda$ ) obtidas do PMP com população inicial de 3 logUFC/g	79
Tabela 3.10 -	Resumo das taxas de crescimento ( $\mu$ ) e fase lag obtidas do ComBase e PMP, considerando pH= 5,5, 1,14% NaCl	80
Tabela 3.11 -	Resumo dos dados de input dos modelos I e II para <i>S. aureus</i> em queijo tipo Minas frescal	82
Tabela 3.12 -	Níveis de exposição, em ng/porção de queijo tipo Minas frescal, a SEA de adolescente, adulto e idoso estimados nos modelos ComBase e PMP	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARM	- Avaliação de Risco Microbiológico
CDC	- Centro de Controle de Doenças
CF	- Constituição Federal
CQUALI-LEITE	- Centro Integrado de Monitoramento da Qualidade do Leite
DTA	- Doença Transmitida por Alimento
EFSA	- <i>European Food Safety Authority</i>
ELFA	- <i>Enzyme Linked Fluorescent Assay</i>
ELISA	- <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAO	- Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
GAL	- Gerenciamento de Amostra Laboratorial
GCQPA	- Gerência de Controle de Qualidade de Produtos e Ambientes
HUS	- <i>Hemolytic Uremic Syndrom</i>
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCQS	- Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde
JEMRA	- <i>Joint FAO/WHO Expert Meeting on Microbiological Risk Assessment</i>
LACEN-DF	- Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal
LACENs	- Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LMAM	- Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiente
MS	- Ministério da Saúde
NATHA	- Núcleo de Agravos e Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar
Nº.	- Número
OMS	- Organização Mundial de Saúde
ONU	- Organização das Nações Unidas
OSP	- <i>Optimum Sensitive Plate</i>
PATEN	- Programa de Análise de Teor Nutricional
PCR	- <i>Polimerase Chain Reaction</i>

PNMQSA	- Programa Nacional de Monitoramento da Qualidade Sanitária de Alimentos
POF	- Pesquisa de Orçamento Familiar
PROIODO	- Programa de Monitoramento de Iodo no Sal para Consumo Humano
PROMAC	- Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes
RDC	- RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA
PVS	Programa da Vigilância Sanitária
SCP	- <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
SEA	- Enterotoxina tipo A
SEB	- Enterotoxina tipo B
SEC	- Enterotoxina tipo C
SED	- Enterotoxina tipo D
SEE	- Enterotoxina tipo E
SEG	- Enterotoxina tipo G
SEH	- Enterotoxina tipo H
SEI	- Enterotoxina tipo I
SEJ	- Enterotoxina tipo J
SEs	- Toxinas Estafilocócicas
SFP	- <i>Staphylococcal Food Poisoning</i>
SGA	- Sistema de Gerenciamento de Amostra
SNVS	- Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
TSST-1	- <i>Toxic Shock Staphylococcal Toxin</i>
UFs	- Unidades da Federação
UTI	- Unidade de Tratamento Intensivo
VISAs	- Vigilâncias Sanitárias

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
1.1 MONITORAMENTO DA QUALIDADE SANITÁRIA DE ALIMENTOS.....	3
1.2 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS .....	5
1.3 CARACTERÍSTICAS DA INTOXICAÇÃO ESTAFILOCÓCICA.....	9
1.4 SURTOS DE INTOXICAÇÃO ESTAFILOCÓCICA NO BRASIL E NO MUNDO .....	100
1.5 CONTAMINAÇÃO POR <i>STAPHYLOCOCCUS</i> COAGULASE POSITIVA EM QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL.....	155
1.5.1 A mastite e a contaminação de leite e de queijo.....	188
1.5.2 A manipulação dos produtos lácteos e a contaminação estafilocócica....	199
1.6 MODELOS MATEMÁTICOS DE MICROBIOLOGIA PREDITIVA .....	20
1.6.1 Predição de variável por redes neurais artificiais.....	23
1.7 AVALIAÇÃO DO RISCO MICROBIOLÓGICO .....	24
1.7.1 Identificação do perigo.....	26
1.7.2 Caracterização do perigo ou dose-resposta .....	27
1.7.3 Avaliação da exposição .....	30
1.7.4 Caracterização do risco .....	31
1.7.5 Gestão do risco.....	32
1.7.6 Comunicação do risco.....	33
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO II – <i>Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, Brazil</i></b> .....	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO III – AVALIAÇÃO DE RISCO DA EXPOSIÇÃO A <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> PELO CONSUMO DE QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL</b> .....	<b>55</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	56
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.2.1 Fonte de dados .....	57
3.2.1.1 Consumo de queijo tipo Minas frescal no Brasil .....	57
3.2.1.2 Frequencia e nível de contaminação de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em queijo tipo Minas frescal .....	58

3.2.1.3 Temperatura de armazenamento e pH.....	58
3.2.2 Modelo de predição do risco de contaminação por rede neural artificial ...	59
3.2.3 ComBase .....	60
3.2.4 <i>Pathogen Modeling Program</i> .....	61
3.2.5 Avaliação da exposição à enterotoxina estafilocócica pelo consumo de queijo tipo Minas frescal .....	61
3.2.5.1 Descrição das variáveis do modelo .....	61
3.2.6 Caracterização de risco da exposição a enterotoxina A (SEA).....	65
3.3 RESULTADOS.....	65
3.3.1 Avaliação dos dados.....	65
3.3.2 Predição de risco de contaminação por rede neural artificial.....	72
3.3.3 Estimativas de taxa de crescimento.....	74
3.3.3.1 ComBase.....	74
3.3.3.2 Modelo PMP .....	78
3.3.4 Avaliação da exposição à enterotoxina A estafilocócica (SEA) pelo consumo de queijo tipo Minas frescal .....	81
3.4 DISCUSSÃO .....	85
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>111</b>

## RESUMO

Vários estudos conduzidos no Brasil demonstram a presença de bactérias patogênicas nos alimentos, cujo consumo pode causar doenças e transtornos de origem alimentar. O presente estudo acessou os dados da qualidade higiênico-sanitária de 4.576 amostras de alimentos prontos para o consumo analisadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF) no período 2000-2010, e dados de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) investigadas pelo Núcleo de Agravos e Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (NATHA) no mesmo período. Os grupos de alimentos pratos prontos para o consumo e leite e derivados foram os grupos mais analisados e reprovados pelo referido Laboratório (20 e 16%, respectivamente). Particularmente, as amostras de queijo tipo Minas frescal apresentaram alta frequência de contaminação com *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP). Os pratos prontos para o consumo foram os alimentos mais envolvidos nos casos de DTA reportados pelo NATHA, sendo que os patógenos mais frequentes foram o *Bacillus cereus* e o *S. aureus*. Conduziu-se, então, um estudo de avaliação de risco da exposição a toxina estafilocócica A (SEA) pelo consumo de queijo tipo Minas frescal. Os programas ComBase e *Pathogen Modeling Program* foram utilizados para estimar a taxa de crescimento e tempo de fase lag de *S. aureus*. Os dados de SCP em queijo Minas frescal obtidos de 338 amostras analisadas por dez LACENs do Brasil foram assumidos como *S. aureus*, e os dados de consumo foram obtidos da POF 2008/2009. Fez-se ainda uma avaliação probabilística da exposição utilizando o programa @risk (Palisade®). O risco da população brasileira de consumir uma porção de queijo tipo Minas frescal com dose de SEA acima da dose tóxica (100 ng) foi estimada em no máximo  $3 \times 10^{-5}$ . Este trabalho tem uma série de limitações, principalmente devido à ausência de dados de *S. aureus*, e deficiência de dados de temperatura de armazenamento no posto de venda, e pH do queijo tipo Minas frescal. Os resultados devem ser considerados pelos LACENs e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de modo a melhorar os programas de monitoramento no País, objetivando a geração de dados mais robustos que possibilitem a condução de estudos de avaliação de risco mais consistentes.

**Palavras-chave:** doenças transmitidas por alimentos; queijo tipo Minas frescal; avaliação de risco microbiológico; *Staphylococcus aureus*.

## ABSTRACT

Several studies conducted in Brazil have shown the presence of pathogens in food, which consumption may cause foodborne diseases (FBD). The present study investigated microbiological analysis reports of 4,576 food ready for consumption samples analyzed by the LACEN-DF from 2000 to 2012, and information on FBD outbreaks that took place in the Federal District in the same period obtained from the Office of Water and Foodborne Diseases (NATHA). Ready-to-eat food and milk and dairy products were the food groups most analyzed and with the highest rejection rate (20 e 16%, respectively) analyzed by the LACEN-DF. Fresh *Minas* cheese had a high prevalence of coagulase-positive *staphylococci* (CPS) counting. Ready-to-eat food was the food group most involved in the FBD outbreaks reported by NATHA, and *Bacillus cereus* and *S. aureus* the most prevalent pathogens. A microbiological exposure risk assessment study was conducted for *Staphylococcus* enterotoxin A (SEA) in fresh *Minas* cheese. ComBase and Pathogen Modeling Program models were used to predict bacterial growth rate and lag phase parameters. CPS data in fresh *Minas* cheese obtained for 338 samples analyzed by ten LACENs were used as *S. aureus* information. Consumption data were obtained from the POF 2008/2009. Exposure assessment and risk characterization were performed using @risk (Palisade). The estimated risk of intoxication by the Brazilian population from the consumption of fresh *Minas* cheese containing SEA at levels higher than the toxic dose (100 ng) reached  $3 \times 10^{-5}$ . This study has many limitations, mainly related to the lack of *S. aureus* data in fresh *Minas* cheese samples, e and deficiency of other relevant information such as storage temperature at retail, and pH. The results of this study should be considered by the LACENs and the National Surveillance Agency aiming at improving the monitoring programs producing a sounder database that would allow the conduction of consistent microbiological risk assessment studies in the country.

**Keywords:** foodborne diseases, fresh *Minas* cheese, microbiological risk assessment, *Staphylococcus aureus*.

## INTRODUÇÃO

Em geral, as pessoas têm expectativas de consumir alimentos seguros. As doenças e transtornos de origem alimentar são altamente desagradáveis ao consumidor, causando a desconfiança da qualidade dos produtos disponíveis no mercado (CAC, 2003). Vários estudos conduzidos no Brasil demonstram a presença de bactérias indicadoras de qualidade microbiológica e bactérias patogênicas nos alimentos disponíveis para consumo da população (Boari et al., 2004; Pereira et al., 2006; Landeiro et al., 2007; Oliveira et al., 2011), bem como ao longo da cadeia produtiva, principalmente de leite e derivados (Saboya, 1998; André et al., 2008; Zafalon et al., 2009). Quase nove (9) mil surtos de intoxicação alimentar foram reportados ao Ministério da Saúde (MS) entre 2000 e 2011. *Salmonella* spp e *Staphylococcus aureus* estão entre os principais agentes envolvidos em tais intoxicações (Brasil, 2013).

As estratégias governamentais visando a proteção da população contra as doenças e os agravos causados pelo consumo de alimentos de má qualidade tem incluído alguns programas de monitoramento de alimentos, apoiados em um arcabouço legal (Tebbutt, 2007). No Brasil, tais programas são realizados no âmbito das vigilâncias sanitárias estaduais (VISAs) e os laboratórios centrais (LACENs) de todo país (ANVISA, 2013). Adicionalmente, programas de educação para o manejo dos perigos microbiológicos, tal como publicações das práticas adequadas de higiene de alimentos, cartilhas de hábitos simples de manipulação de alimentos, tornam-se importantes para diminuir o risco à população (Pelicioni, Pereira, 2003; Landeiro et. al., 2007; Ávila et al., 2010). Os produtores de alimentos, por sua vez, devem reconhecer seu papel na manutenção de níveis higiênico-sanitários seguros, à medida que implementam medidas de controle na produção e transporte dos alimentos (ILSI, 2007; EPA, 2012).

A Avaliação de Risco Microbiológico (ARM) é uma ferramenta que pode ser utilizada pelos gestores da saúde para avaliar a exposição da população a um determinado perigo e subsidiar estratégias gerencias locais que visem a diminuição deste tipo de exposição, quando da apresentação de um risco eminente (Rocourt et al., 2003). No âmbito internacional, o *Joint FAO/WHO Expert Meeting on*

*Microbiological Risk Assessment* (JEMRA) utiliza tal ferramenta para subsidiar o estabelecimento produtor e a revisão dos padrões microbiológicos em alimentos estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (CAC, 2003; FAO/WHO, 2006). O delineamento da ARM pode ser simples ou complexo, dependendo da disponibilidade dos recursos humanos envolvidos, da estrutura laboratorial e tecnológica e da estratégia de rastreabilidade do fluxograma de produção do alimento até o consumo (ILSI, 2007). A carência de recursos humanos e laboratorial e de disponibilidade de dados de contaminação de alimentos são alguns fatores que limitam a condução de estudos de avaliação de risco no Brasil – um desafio proposto pelo presente estudo.

## **CAPÍTULO I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 MONITORAMENTO DA QUALIDADE SANITÁRIA DE ALIMENTOS**

A gestão da segurança alimentar e a harmonização dos procedimentos de controle de qualidade tem como principais demanda o aumento da globalização da cadeia alimentar. Tem-se aí um maior conhecimento e discernimento da população, dos problemas associados com a produção alimentar e, particularmente, àqueles relacionados ao controle de qualidade e às inovações no desenvolvimento de produtos, com controles dos pontos críticos mais confiáveis que possibilitam o monitoramento e rastreabilidade (Stringer, 2005).

O Programa Nacional de Monitoramento da Qualidade Sanitária de Alimentos (PNMQSA), desenvolvido pela área de alimentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desde o ano de 2000, fundamenta-se no controle e fiscalização de amostras de diversos produtos alimentícios expostos ao consumo, conforme a avaliação do padrão sanitário (ANVISA, 2013). É um dos instrumentos efetivos para a verificação da conformidade dos produtos com as legislações sanitárias; fornece resultados analíticos que permitem traçar o perfil dos distintos alimentos e identificar os setores produtivos que necessitam de intervenção de caráter preventivo, a fim de garantir a melhoria da qualidade sanitária dos alimentos comercializados no país.

O referido Programa tem os seguintes objetivos:

- monitorar a qualidade sanitária e de rotulagem dos alimentos;
- estabelecer um histórico de qualidade dos alimentos via geração de bancos de dados e relatórios manuais ou gerados pelos sistemas de informatização como sistema de gerenciamento de amostra (SGA) e gerenciamento de amostra laboratorial (GAL);
- identificar as categorias de alimentos dispensados de registro, que devem integrar-se àquele de grupo de alimentos com obrigatoriedade de registro;
- identificar os setores da área de alimentos que necessitam de uma intervenção institucional de abrangência nacional e de caráter preventivo no processo produtivo;

- adotar as medidas legais no caso de detecção de irregularidades em determinado alimento e/ou estabelecimento responsável pela sua produção; e
- estabelecer intercâmbio interinstitucional contínuo sobre as informações dos alimentos analisados e as providências adotadas (ANVISA, 2013).

A responsabilidade e condução do PNMQSA é compartilhada pelo Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde (INCQS), órgãos de Vigilância Sanitária das Unidades Federadas (VISA) e os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs) que constituem o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), originários da Constituição Federal (CF) de 1988.

Dentre os programas desenvolvidos no âmbito do PNMQSA, é possível destacar o Programa de Análise de Teor Nutricional (PATEN), o programa do Centro Integrado de Monitoramento da Qualidade do Leite (CQUALI-LEITE), o Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes (PROMAC), o Programa de Monitoramento de Iodo no Sal para Consumo Humano (PROIODO) e o Programa da Vigilância Sanitária do Distrito Federal (PVS), que contempla os pratos prontos para o consumo e produtos alimentícios localmente importantes (ANVISA, 2013). Além de análises laboratoriais, os referidos programas incluem inspeções sanitárias nos estabelecimentos fabricantes dos alimentos, interdição e apreensão de produtos com laudos condenatórios e notificação às empresas para a adequação dos alimentos às legislações sanitárias.

A comunidade científica também pode participar do processo ofertando suporte adicional no delineamento dos programas, sinalizando novas incidências de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) ou novos perfis de consumo, e desenvolvendo e validando novos métodos laboratoriais. A indústria também é uma fonte irrefutável de conhecimento, pois tem implementada os melhores sistemas de qualidade, possui valioso banco de dados e tem conhecimento do processo de produção e sua interferência na qualidade microbiológica dos alimentos (ILSI, 2007; Todd, 2011).

A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n° 12/2001 estabelece os critérios microbiológicos para os alimentos destinados ao consumo humano, cujos parâmetros permitem avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos, e os

sistemas de qualidade, identificar, quantificar, mitigar e prevenir os riscos de DTA (Brasil, 2001; Àvila et al., 2010).

## 1.2 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

As DTAs são um problema mundial de saúde pública, e preveni-lo é a grande meta. São transmitidas principalmente por bactérias e toxinas, e a importância dos diferentes patógenos em cada país depende dos costumes de consumo, processamento, preparo, manipulação, técnicas de armazenamento e sensibilidade da população. A eliminação total dos patógenos é impossível, mas pode-se reduzir a incidência dos casos e, assim, do risco da doença (Stewart et al., 2003).

O perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos no Brasil é pouco conhecido. Somente alguns Estados e/ou Municípios dispõem de estatísticas e dados sobre os alimentos mais frequentes, agentes etiológicos mais comuns e, raramente, têm informações sobre subpopulações e fatores de risco. A incidência varia de acordo com a educação, as condições socioeconômicas, o saneamento, os fatores ambientais e culturais identificados em cada localidade. Presume-se uma alta morbidade, mas não se conhece sua magnitude. A mortalidade depende das condições do paciente, do agente etiológico e do acesso aos serviços de saúde. Os grupos etários menores de 5 anos de idade, imunodeprimidos e idosos são de alta importância devido à mortalidade por diarreia (Brasil, 2010 – Manual de DTA).

É possível definir um surto de DTA como a ocorrência de dois ou mais casos de doenças similares resultantes do consumo de um alimento contendo alguma bactéria patogênica (WHO, 2008). O quadro mais comum de DTA apresenta-se na forma de distúrbios gastrointestinais, podendo evoluir para sintomas neurológicos, aborto ou desordens imunológicas, falência múltipla de órgãos, doenças crônicas e morte, constituindo-se um problema mundial de saúde pública. Em caso de botulismo, um único caso é considerado um surto (WHO, 2008; CDC, 2012). Em todo o mundo, dá-se a subnotificação, devido, principalmente, a negligência dos eventos gastrointestinais pelos próprios pacientes e rápida recuperação, em geral, sem atendimento médico (Sandel, Mckillip, 2004; FDA/BAD BUG BOOK, 2012).

O Centro de Controle de Doenças de saúde pública americano (CDC, 2012) reportou entre o 1º de janeiro 2009 a 31 de dezembro 2010, 1.527 surtos de DTA, que resultaram em 29.444 casos de doenças, 1.184 hospitalizações e vinte e três mortes. Entre os 790 surtos com confirmação laboratorial, norovírus foi o agente etiológico mais comumente reportado (42% dos surtos), seguido por *Salmonella*, responsável por 30% dos surtos. Cerca de 4% dos casos (1184) resultaram em hospitalização, 49% devido a *Salmonella*, seguido de *Escherichia coli* Shiga toxin-producing (STEC O157, 16%), e norovírus (9%). Os surtos causados por *Listeria* spp resultaram em alta proporção de pessoas hospitalizadas (82%), seguida por *Clostridium botulinum* (67%), e intoxicação paralítica por toxinas de moluscos (67%). Entre as vinte e três mortes, vinte e dois óbitos foram causados por bactérias (nove por *Listeria monocytogenes*, cinco por *Salmonella*, quatro por *Escherichia coli* STEC O157, três por *Clostridium perfringens*, e um por *Shigella*), e um por norovírus. Entre 2000 e 2008, estima-se que ocorreram 241.188 casos de intoxicação estafilocócica, com 1.064 hospitalizações e seis mortes/ano (Scallan, 2011).

Na Europa, a autoridade europeia de segurança alimentar (*European Food Safety Authority* (EFSA) reportou em 2009, um total de 5.550 casos de surtos, afetando quase 49.000 pessoas com 46 óbitos identificados. Entre estes, 293 foram causados por toxinas de *Staphylococcus* spp., *Bacillus* e *Clostridium*, constituindo a quarta maior causa de surtos alimentares na região (EFSA, 2011).

Um estudo retrospectivo de Paniselo et al., (2000) descreveu quinhentos e trinta surtos na Inglaterra e País de Gales entre 1992 e 1996, sendo que mais da metade deles (54,9%) foram associados a *Salmonella* spp., sessenta e cinco associados a *Clostridium perfringens* (12,3%), vinte e três associados a escrombotoxina (4,3%), vinte e dois associados a *Bacillus* spp. (4,2%), doze associados a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (2,3%) e dez casos associados a *Campylobacter* spp. (1,9%). Em 23% dos surtos, o agente etiológico foi confirmado por análise microbiológica; em 31,1%, fez-se a confirmação por associação estatística; e, em 32,6%, identificaram-se surtos por descrição epidemiológica com forte associação circunstancial. Mais de 13,2% dos surtos não tiveram o agente etiológico confirmado, e os alimentos de origem animal foram os mais implicados (64,3%), principalmente a carne vermelha. Entre os principais fatores que

contribuíram para os surtos, encontram-se uso de temperatura incorreta de preparo e armazenamento (79%) e a manipulação inadequada (31%).

Gormley et al., (2011) descreveram que metade dos 2.429 surtos ocorridos no país de Gales, entre 1992 e 2008, foram causados por *Salmonella* spp., embora tal proporção tenha reduzido durante o período, bem como a proporção de surtos causados por *C.perfringens*. Os alimentos mais frequentes nestes surtos foram carne vermelha e de aves e os alimentos mistos. Os fatores que contribuíram para redução dos surtos devem-se a implementação de medidas de controle dos pontos críticos.

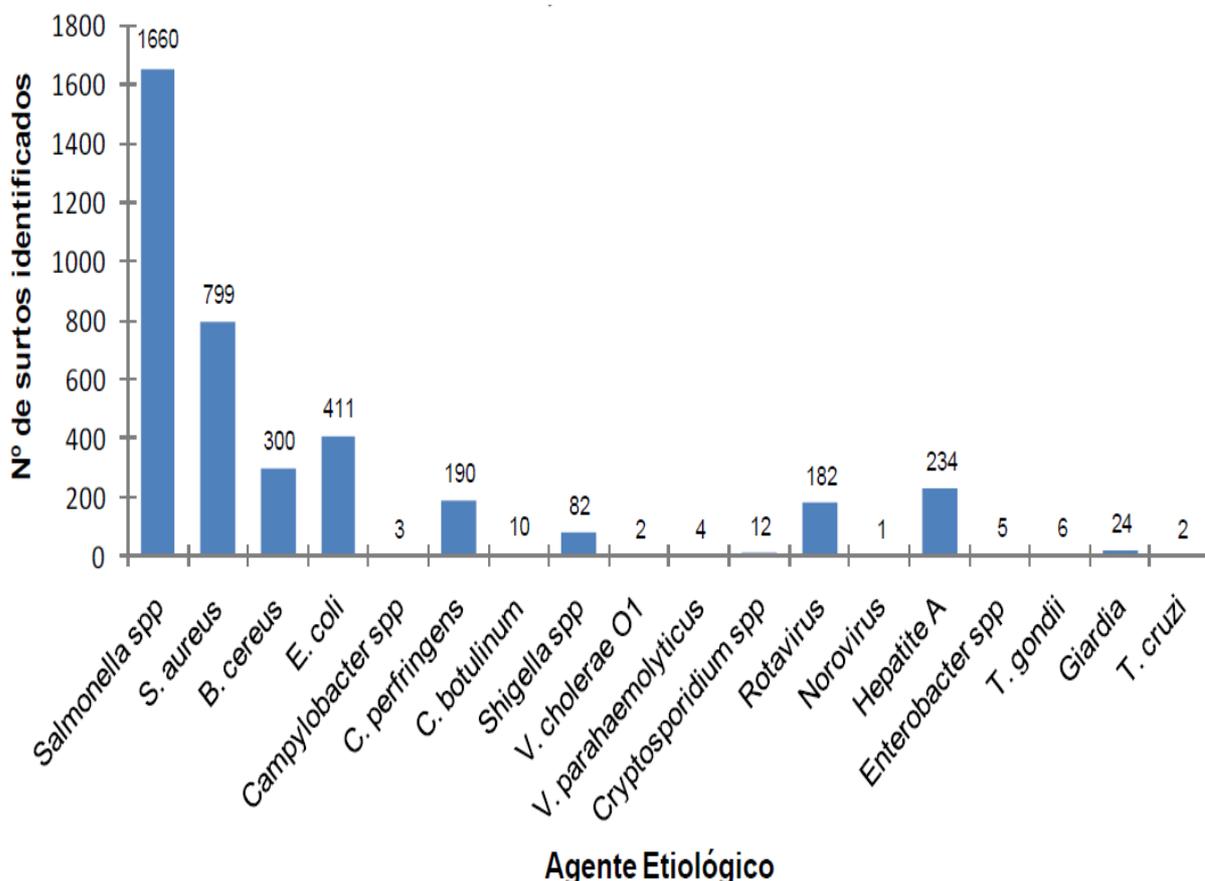
Na Alemanha, Qin et al. (2011) investigaram um surto ocorrido em maio de 2011, que resultou em 3.222 pacientes infectados por *Escherichia coli* O104:H4 dos quais 39 foram a óbito. Em torno de 25% dos pacientes desenvolveram síndrome hemolítico-urêmica (SHU) (hemolytic uremic syndrom - HUS),. O surto foi associado ao consumo de broto de alfalfa (*raw sprouts*) tratado com feno (*fenugreek seeds*) importado do Egito.

Na Escócia, a equipe de Locking et al. (2011), da agência nacional de saúde reportou, entre janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2008, um total de 2.228 casos de *E. coli* O157:H7, média de 223 por ano e taxa de incidência de 4,4 casos por 100.000 habitantes, com idades entre 4 meses a 97 anos (mediana de 21 anos). Do total, 1.118 casos reportados entre 2004-2008, 660 (59%) tiveram diarreia sanguinolenta, e 41% dos pacientes foram hospitalizados.

Em Taiwan, a agência de saúde nacional reportou 274 surtos alimentares com 12.845 casos e três mortes, entre os anos de 1991 a 2000. As principais bactérias envolvidas foram: *Bacillus cereus*, *S. aureus* e *Vibrio parahaemolyticus* devido, principalmente, a manipulação incorreta de frutos do mar, produtos cárneos e cereais (Jahan, 2012).

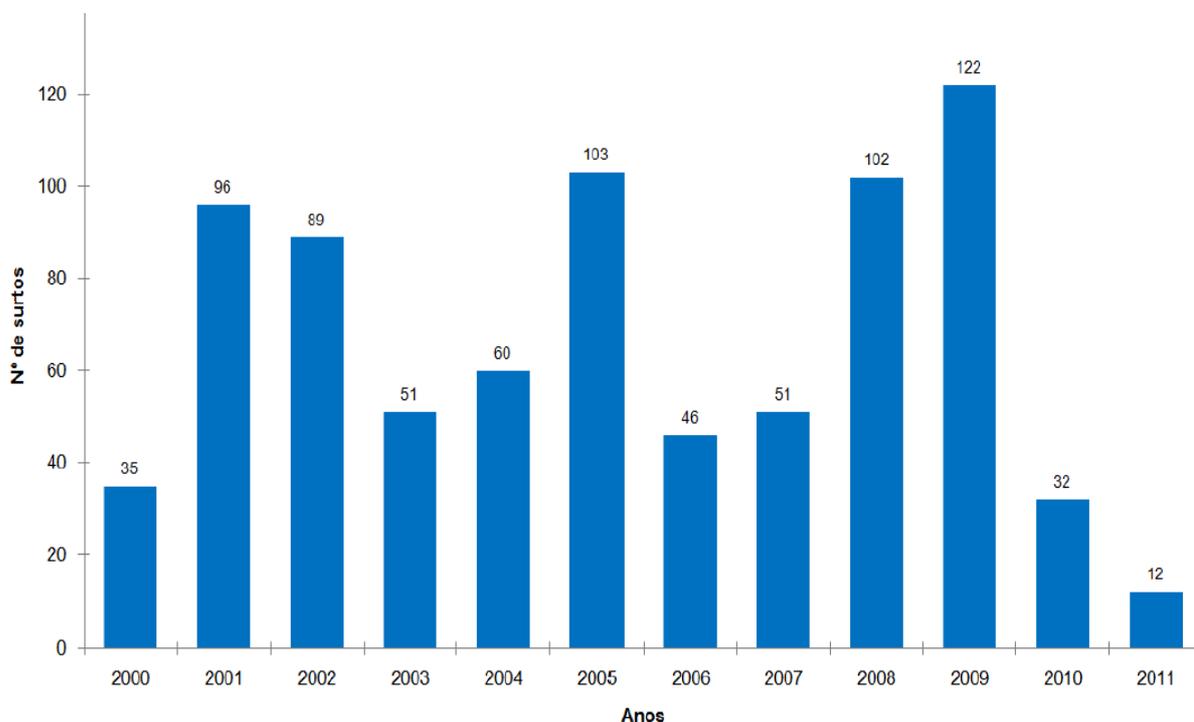
No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) reportou 8.663 surtos entre os anos de 2000 e 2011 (Brasil, 2013), sendo que a região Sul notificou 42,1% dos surtos; a região Sudeste 37,4%; a região Centro-Oeste 5,2%; a região Nordeste 12%; e a região Norte 3,5%. Os Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná e Santa Catarina foram as Unidades da Federação (UFs) que apresentaram maior registro de surtos, o que pode estar relacionado com a melhor implantação do sistema de

Vigilância Epidemiológica-DTA nos municípios, mas ainda ocorre a subnotificação (Oliveira et al., 2010; MS, 2012b). Do total, 3.927 tiveram o agente etiológico identificado, principalmente *Salmonella* spp e *S. aureus* (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Número de surtos por agente etiológico entre 2000 e 2011 reportados pelo Ministério da Saúde. Fonte: SVS/MS.

A Figura 1.2 mostra o número de surtos envolvendo *S. aureus* durante o período. Entre os alimentos identificados (N=3487), os mistos foram responsáveis por 1.502 surtos, seguidos dos a base de ovos, (909 surtos); doces e sobremesas (490 surtos), carne bovina *in natura*, processados e miúdos (358 surtos), e leite e derivados (350 surtos). Os locais de maior ocorrência foram as residências (3746 surtos), restaurantes (1296 surtos), creches e escolas (657 surtos) e eventos públicos (255 surtos).



**Figura 1.2** Número de surtos no Brasil envolvendo *S. aureus*, período 2000-2011.

Fonte: Sinan Net/SVS/MS.

### 1.3 CARACTERÍSTICAS DA INTOXICAÇÃO ESTAFILOCÓCICA

As intoxicações estafilocócicas (*Staphylococcal food poisoning*, SFP) estão associadas ao patógeno *S. aureus*, presente na região nasal, pele e mãos, e principal responsável por contaminações cruzadas de superfícies de produção e de preparo dos alimentos (Sospedra et al., 2013). *S. aureus* é referenciado como a quinta causa de DTA em todos os surtos identificados na Europa (EFSA, 2011). As toxinas estafilocócicas (SEs) são comumente associadas aos surtos envolvendo alimentos, principalmente, leite e queijo, sucos, enlatados cárneos e pratos prontos para o consumo. O patógeno é veiculado pelo leite contaminado de animais sujeitos a mastite e manipulação excessiva e contaminação cruzada de diferentes alimentos, (Argudim, 2010). As SEs são resistentes a alta temperatura, radiação gama e baixo pH (Marta et al., 2011).

De acordo com as diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2008), são caracterizados casos de intoxicação estafilocócica aqueles indivíduos que apresentarem, predominantemente, vômito e período de incubação curto (menos de 8 horas). Sinais de toxicidade sistêmica, como febre e hipotensão, são raramente observados na SFP, que é autolimitada e tem cura em 24-48 horas após o início dos sintomas. A incidência real de SFP é desconhecida, e é possível que a imunidade humana em relação a este patógeno seja eficaz, porque diferentes anticorpos se ligam a diferentes epitópos de SE. Por exemplo, anticorpos heterólogos a enterotoxina tipo B (SEB) podem conferir proteção cruzada contra a enterotoxina tipo C (SEC) (Dinges et al., 2000; Argudin et al., 2010; Tasci et al., 2011).

#### 1.4 SURTOS DE INTOXICAÇÃO ESTAFILOCÓCICA NO BRASIL E NO MUNDO

Segundo o MS, a intoxicação por *S. aureus* é a segunda maior causa de surtos no Brasil (Figura 1.1). Alguns estudos publicados na literatura investigaram algumas ocorrências no País. Sabioni et al. (1988) investigaram um surto ocorrido em 1987 em Ouro Preto, Minas Gerais, com suspeita de envolvimento de queijo tipo Minas frescal consumido por uma família. A análise microbiológica resultou em isolamento de *Staphylococcus* coagulase e termonuclease positiva com enumeração de  $9,3 \times 10^7$  UFC/g;  $1,1 \times 10^5$  NMP/g de coliformes e resultado negativo para *Salmonella* spp. Os sintomas predominantes foram: náusea, vômito, diarreia e dor abdominal. A não observância da febre indica um caso típico de intoxicação alimentar. O período de incubação deu-se em média de uma hora. Foram isoladas 10 linhagens de *S. aureus*, dos quais 80% produziram a enterotoxina tipo A (SEA), 20% produziram a SEB, 30% produziram a enterotoxina tipo D (SED), e 10% produziram a enterotoxina tipo E (SEE). Conforme as informações adquiridas sobre a dieta dos membros da família investigada, identificaram-se fortes evidências de que o queijo foi o alimento causador da intoxicação por toxinas de *S. aureus*.

Carmo et al. (2002) descreveram dois surtos de intoxicação ocorridos em Minas Gerais, em 1999. No primeiro surto, 50 pessoas apresentaram sintomas de vômito, diarreia, cólica, calafrios e dor de cabeça, após consumirem queijo tipo

Minas frescal. A vigilância sanitária local foi notificada e coletou três pedaços de queijos e uma amostra de leite cru utilizada na fabricação do referido queijo. As amostras de queijo apresentaram coagulase e termonuclease positivas, confirmando *S. aureus*, com presença de SEA, SEB e SEC, e enumerações maiores que  $2 \times 10^8$  UFC/g; o leite cru apresentou somente SEA e SEB. No outro surto investigado, envolvendo 328 pessoas que reportaram sintomas de diarreia e vômito, foram coletadas amostras de leite cru de tanques refrigerados de distribuição para os consumidores, e água da torneira. As análises resultaram em colônias coagulase e termonuclease negativas de *Staphylococcus*, produtor de SEC e SED.

Em outro estudo, Carmo et al. (2003) investigaram um surto alimentar na cidade de Passos, Minas Gerais, envolvendo quarenta e duas pessoas e o consumo de frango empanado, arroz, feijão, tomate e purê de grão-de-bico. Trinta e uma pessoas ficaram doentes e seis necessitaram de atendimento hospitalar. Conforme a análise dos alimentos suspeitos, identificou-se a presença de *Staphylococcus* capaz de produzir toxinas SEA, SEB e SED no frango, com enumeração maior que  $2 \times 10^8$  UFC/g, o qual pode ter sido veiculado pelos manipuladores do produto. Análise de *swabs* obtidos de nariz e garganta de quatro manipuladores resultaram em isolamento de *Staphylococcus* com capacidade de produzir SEB, SEC e SED e/ou Toxic Shock Staphylococcal Toxin (TSST-1).

Carmo et al. (2004) também investigaram um surto ocorrido em um evento na região oeste de Minas Gerais envolvendo 8.000 pessoas, das quais 4.000 apresentaram sintomas de intoxicação como, náusea, vômito, diarreia, dores abdominais e tontura. Foram coletadas amostras de alimentos e realizado *swab* de região de nasofaringe e abaixo das unhas dos manipuladores de alimentos. O preparo do alimento envolvido foi iniciado na sexta-feira e finalizado no sábado de manhã e estocado em temperatura ambiente até o dia seguinte, quando foi servido. Quase 400 indivíduos (396) foram internados, 81 na Unidade de Tratamento Intensivo devido à severa desidratação, 16 foram a óbito dentro de 72 horas indivíduos (maiores que 65 anos e menores de 5 anos). As análises dos alimentos confirmaram a presença de cepas de *Staphylococcus* coagulase e termonuclease positivas em níveis maiores que  $2 \times 10^8$  UFC/g, com presença de SEA na concentração de 6 µg/g de alimento, detectado pelo teste *Enzyme-Linked*

*Immunosorbent Assay* (ELISA). Todas as análises de *swab* das mãos dos manipuladores foram positivas para *S. aureus*, com presença de genes produtores de enterotoxinas SEA, SEB e SEG, detectados por *Polimerase Chain Reaction* (PCR). Os autores levantaram a hipótese de que a contaminação foi veiculada pelos manipuladores, e as condições de armazenamento propiciaram o desenvolvimento do micro-organismo e produção de toxinas (~48 h., e temperatura média de 35°C).

Dias et al. (2008) investigaram 139 surtos de toxinfecção alimentar ocorridos em 73 municípios mineiros no período de janeiro de 2006 a julho de 2008, e avaliaram as fichas de inquérito de aproximadamente 2.800 pessoas, entre crianças, jovens e adultos. Mais da metade dos indivíduos tiveram confirmação de SE com predominância de vômito e diarreia e período de incubação inferior a seis horas. Os alimentos suspeitos mais frequentes foram queijos, refeições prontas e produtos de confeitaria, o que sugere possíveis falhas na seleção da matéria-prima, processamento e armazenamento. Metade das fichas de inquérito epidemiológico não apresentava informações sobre o número de pessoas doentes/expostas, o que elevou consideravelmente o número de pessoas envolvidas. Foram investigadas em 91 amostras a presença de enterotoxinas por ELISA e a capacidade enterotoxigênicas de isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP,  $>10^5$  UFC/g) pelo método *Optimum Sensitive Plate* (OSP) para SEA, SEB, SEC e SED. Cerca de 40% dos surtos foram confirmados pela presença nos alimentos de enterotoxinas, principalmente SEA.

A Tabela 1.1 resume os resultados dos principais estudos de investigação de surtos estafilocócicos no Brasil. Na maioria deles, foi isolada linhagem de *S. aureus* capaz de produzir enterotoxina SEA, ou esta toxina foi detectada na amostra analisada.

**Tabela 1.1** Sustos estafilocócicos no Brasil

<b>Estudo</b>	<b>Surto/UF</b>	<b>Alimento</b>	<b>Tipo de SE*</b>
<b>Sabioni et al., (1988)</b>	Família (MG)	Queijo minas frescal (QMF)	80% linhagens SEA
<b>Carmo et al., (2002a)</b>	50 pessoas (MG)	QMF	Deteção de SEA, SEB, SEC
<b>Carmo et al., (2002b)</b>	328 pessoas (MG)	Leite cru	Deteção de SEC, SED
<b>Carmo et al., (2003)</b>	42 pessoas (MG)	Pratos com frango	Linhagens de SEA, SEB e SED
<b>Carmo et al., (2004)</b>	2000 internações, 16 óbitos (MG)	Refeições mistas	Deteção única de SEA 6µg/g
<b>Dias et al., (2008)</b>	139 surtos, 2006-2008 (MG)	QMF e refeições mistas	39,1% dos surtos – linhagens de SEA

Vários estudos reportam surtos de intoxicação estafilocócica ocorridos em outras regiões do mundo. Na Índia, o consumo de *raita*, alimento típico à base de iogurte, aumentou em vinte uma vezes o risco de intoxicação em relação aos não consumidores (Mustafa et al., 2009). A análise do alimento e *swab* das mãos dos manipuladores e refrigeradores foi positiva para SCP, indicando contaminação cruzada. Outro estudo conduzido naquele país investigou um surto ocorrido em 2005, onde as pessoas consumiram *bhalla*, um alimento frito feito de batata (Nema et al. (2007). Mais de 100 pessoas apresentaram sintomas típicos de intoxicação estafilocócicas após quatro horas do consumo, a maioria crianças, mas todos se recuperaram dentro de 12-24 horas. Algumas amostras do alimento e três amostras clínicas de vômito apontaram a presença combinada de SEA e SED.

Evenson et al. (1988) investigaram um surto ocorrido numa escola americana, onde 850 estudantes de 5-19 anos de idade ficaram doentes 3-4 horas após o consumo de leite achocolatado, apresentando vômito e diarreia. Análise do leite por ELISA indicou concentrações de SEA entre 94 e 184 ng/mL.

Kérouanton et al. (2007) analisaram 178 cepas de SCP isoladas durante a investigação de 31 surtos entre 1981 e 2002 em várias cidades da França. Foram obtidos 33 isolados diferentes de *S. aureus*, a maioria (84%) pertencente a um biotipo humano e o restante associado a ovinos ou não especificados. Apenas dois isolados foram sensíveis a todos antimicrobianos testados (cádmio, arsenato, mercúrio, brometo de etídio, estreptomicina, penicilina, macrolídio-lincosamida-streptogramina-B induzível, canamicina, tobramicina, neomicina, ácido fusídico, tetraciclina, estreptogramina A, pefloxacim, meticilina, minociclina, acriflavina) e todos foram resistentes a pelo menos três antibióticos. Todas as cepas que apresentaram genes *sea-sed* foram positivas para detecção de enterotoxina.

Solano et al. (2013) investigaram um surto ocorrido em 2011 numa de Barcelona (Espanha). O surto envolveu 91 pessoas, 42 apresentaram gastroenterites, com mediana de idade de 09 anos para crianças e 24 anos para os adultos. Os sintomas mais frequentes foram dor abdominal (95,2%), vômito (88,1%), diarreia (82,5%), náusea (78,6%) e febre (37%). Um terço dos indivíduos foi hospitalizado, com duração média de 1-3 dias e o período de incubação entre 1-3 horas após a exposição. Das treze amostras de vômito coletadas, oito continham enterotoxinas SEA e SAB. *Swabs* nasal e bilateral de unha de 03 manipuladores apresentaram cultura de *S. aureus* com capacidade de produzir enterotoxinas SEA e SED. As SEA e SED foram detectadas no macarrão, tuna e tomates acompanhando nuggets de peixe com enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva de  $3,2 \times 10^6$  UFC/g, além de aeróbios mesófilos com  $3 \times 10^8$  UFC/g e coliformes  $>1,5 \times 10^6$  UFC/g; no tomate fresco foi encontrada a mesma sequência;  $2,9 \times 10^4$  UFC/g,  $2,9 \times 10^4$  UFC/g,  $2,5 \times 10^5$  UFC/g de *Staphylococcus*, mesófilos e coliformes, respectivamente, e  $3,5 \times 10$  UFC/g de *Bacillus cereus*. Nenhuma amostra foi positiva para *Salmonella* spp.

Asao et al. (2003) investigaram um surto ocorrido em 2000 em Kansai, Japão, envolvendo 13.420 pessoas. Os alimentos suspeitos foram leite desnatado e iogurte, fabricados com leite em pó. Indivíduos entre 0 a 10 anos foram os mais atingidos. Mais de 85% dos indivíduos desenvolveram pelo menos um sintoma de intoxicação dentro de 24 h após o consumo dos produtos lácteos, principalmente, diarreia (75,9%), vômito e náusea (73,3%), dor abdominal (49%) e febre moderada (11,9%). Foram quarenta e quatro casos confirmados laboratorialmente, dos quais

trinta e sete causados pela ingestão de SEA entre 20-100 ng, com média de 55,6 ng, por indivíduos de zero e mais de cinquenta anos. Ikeda et al. (2005) analisaram o leite em pó usado como ingrediente dos alimentos que causaram esse surto e constataram a presença de genes *sea*, *seh*, *seg* e *sei* e enterotoxina SEH, produzidas, provavelmente, durante uma queda de energia na fábrica que durou 9 horas. A presença de enterotoxinas no leite em pó confirma que, apesar do micro-organismo ter sido eliminado com a pasteurização, as toxinas não perderam sua atividade biológica.

*S. aureus* foi reconhecido como o segundo agente causador de intoxicação alimentar entre 2003-2006 na Coreia do Sul (Kim et al., 2009). Os produtos à base de carne ou que a tinha como ingrediente, seguido de produtos vegetais foram os veículos mais importantes nas intoxicações. Segundo dados oficiais do país, citado por Yoon et al., (2011), entre 2001-2005 foram reportados 33.353 surtos, dos quais 10,8% foram causados por *S. aureus*. Segundo Min et al. (2013), em 2011 foram registrados no país 249 surtos e 7.105 casos, dos quais 10 surtos (4%) e 323 (4,5%) casos foram causados por *S. aureus*, o terceiro micro-organismo mais associado à doenças de DTA, após *E. coli* e *Salmonella* spp.

## 1.5 CONTAMINAÇÃO POR *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE POSITIVA EM QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL

O queijo tipo Minas frescal é o mais consumido no Brasil (30g/dia/pessoa, IBGE, 2011). O queijo Minas frescal é caracterizado pela cor esbranquiçada e odor suave característico, deve ter formato cilíndrico e pesar entre 0,3 e 5 kg. É um queijo minimamente processado, produzido da coagulação enzimática de leite pasteurizado, de textura macia e de muito alta umidade, exceto se maturado por 60 dias (Brasil,1996; Perry, 2004). Apresenta pH em torno do neutro (6-7), umidade alta (>55%) e baixa concentração de sal (1,4–1,6%) (Silva et al., 2003; Perry, 2004; Rocha et al., 2006; Carvalho et al., 2007; Moraes, et al., 2009; Sangaletti et al., 2009). Devido a essas características físico-químicas, o queijo tipo Minas frescal

constitui um meio favorável para o crescimento de patógenos com potencial de risco de DTA a partir do seu consumo (De Buyser et al., 2001).

No Brasil, 40% dos produtores de leite não são inspecionados (Nero et al., 2008), e a produção ocorre sem controle dos processos térmicos possibilitando o crescimento de patógenos (Ortolani et al., 2010), com propabilidade de produção de enterotoxinas que resistem ao processo de pasteurização e podem permanecer nos derivados lácteos (André et al., 2008; Arcuri et al., 2010).

Entre os patógenos, *S.aureus* é um dos mais abundantes isolados do leite cru brasileiro (Tondo et al., 2000; Catão, de Ceballos, 2001; Carmo et al., 2002; Padilha et al., 2001; Zocche et al., 2002; Silva et al., 2001, 2008, 2010; Lamaita et al., 2005; Santana, et al., 2006; Rezende-Lago et al., 2007; Andrade et al., 2009; Nero et al., 2009; Oliveira et al., 2011). *S.aureus* é o micro-organismo mais comumente isolado de mastite bovina (Tondo et al., 2000; Wang et al., 2009).

Vários estudos no Brasil comprovam a presença de *S.aureus* em queijo tipo Minas frescal. Loguercio e Aleixo (2001) avaliaram as condições higiênico-sanitárias do queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente em Cuiabá, Mato Grosso, por meio da análise de *S. aureus* de trinta amostras obtidas em dois pontos de comercialização. Praticamente todas as amostras (29) apresentaram enumerações superiores a 1000 UFC/g, o limite legal para queijos elaborados com bactérias lácticas. Araujo et al. (2002) analisaram 45 amostras de queijos tipo Minas frescal de diferentes marcas comercializadas no RJ, e em 20% delas foi detectado *S. aureus*, sendo que 18% estavam acima do limite permitido legalmente. Moraes et al. (2009) analisaram 55 amostras do comércio de Viçosa-MG, resultando em enumeração de SCP  $<10^4$  UFC/g e coliformes termotolerantes (em torno de  $3 \times 10^6$  UFC/g) em 31% das 55 amostras analisadas.

Carvalho et al. (2007) analisaram 93 amostras de queijos Minas frescal de diferentes marcas inspecionadas, coletadas em diferentes supermercados de Campinas (SP), em condições adequadas de refrigeração. Cerca de 7,5% das amostras apresentaram enumerações de SCP maiores que  $1,0 \times 10^3$ , e 34% das amostras resultaram em contagens maiores que  $5,0 \times 10^3$  NMP/g coliformes fecais (queijos com umidade  $>55\%$ ), e detecção de *Listeria monocytogenes* em 11,8% das amostras.

Ferreira et al. (2010) avaliaram 20 amostras de queijo tipo Minas frescal comercializados em Uberlândia (MG), encontrando 18 amostras com enumeração de SCP entre  $1,7 \times 10^3$  e  $2,6 \times 10^5$  UFC/g. Viçosa et al. (2010) avaliaram 30 amostras de leite cru e 35 de queijo Minas frescal produzidas com leite cru comercializados em Viçosa (MG), utilizando diferentes métodos de plaqueamentos. Resultados usando Baird-Parker indicaram cerca de 50% das amostras SCP, com enumeração média de 4,61 log UFC/mL em leite e 5,11 log UFC/g em queijo. Rodrigues et al. (2011) analisaram 46 amostras de queijo Minas frescal durante um ano, e 91,3% das amostras apresentaram até  $10^3$  UFC/g de SCP, em conformidade com a legislação brasileira, e 6,5% apresentaram valores acima desse limite.

A contaminação por SCP também foi identificada em leite e queijos em outros países. Normanno et al. (2005) encontraram 20,7% das 3.097 amostras de leite e derivados coletados no mercado Italiano SCP, das quais 56,5% eram *S. aureus* e destas, 55,5% produziram enterotoxinas SEA, SEB, SEC e/ou SED, sendo SEC a mais freqüente. No Reino Unido, Little et al. (2008) analisaram 1819 queijos pasteurizados e 2618 queijos termicamente processados, dos quais 2% foram positivos para *S. aureus* com níveis de contaminação  $\geq 10^4$  UFC/g. Cremonesi et al. (2007) analisaram 33 amostras de queijo de leite cru bovinos (23) e caprino (10), frescos ou maturados, provenientes de pequenos e grandes produtores da Itália. Todas as amostras foram positivas para os genes *coa* e *nuc-23rRNA*, confirmando a presença de *S. aureus*, com enumeração acima de  $10^5$  UFC/g. Nenhuma amostra foi positiva para SEA-SEE, entretanto, 32% das cepas *S. aureus* apresentaram genótipo positivo para os genes SEA, SED e SEJ em 10 amostras de queijo produzidos com leite bovino.

Na Suécia, Rosengren et al. (2010) encontraram 69% de amostras de queijos produzidos de leite cru e 29% de leite pasteurizado com presença de SCP, 97% foram confirmados como *S. aureus*, e o restante como *S. intermedius* e *S. hycus*. Entre as cepas de *S. aureus*, 30% não continham gene de enterotoxina *see*, mas 44 e 26% tinham *sec* e uma combinação de *sea*, *seg*, *sei* ou *sea* e *seh*, respectivamente. Foi observado *S. aureus* com o mesmo padrão genético daqueles de laticínios distantes, caracterizando múltiplas rotas de contaminação. Os queijos com leite cru apresentaram 16% de contaminação com nível maior que  $10^5$  UFC/g,

porém, sem presença de enterotoxinas. Os queijos produzidos com leite pasteurizado também não apresentaram enterotoxinas ou patógenos comumente pesquisados, *Escherichia coli* ou *Listeria monocytogenes*. Segundo os autores, o processo de pasteurização foi eficaz para garantir a boa qualidade higiênico-sanitária desses produtos.

Tasci et al. (2011) avaliaram 50 queijos comercializados na Turquia, dos quais três amostras apresentaram enumerações de *S. aureus* entre 5 e 8,2 log UFC/g e presença das enterotoxinas SEB, SEC e SEE. Abdou et al. (2012) analisaram amostras de queijos comercializados em Sharkia (Egito) e identificaram genes de enterotoxinas *sea-see* e bandas de proteínas específicas de *S. aureus* conhecidas por fatores de virulência hemolisina  $\beta$ , lecitinase e proteinases (caseína), as quais caracterizam a patogênese desse micro-organismo.

### **1.5.1 A mastite e a contaminação do leite e queijo**

A mastite subclínica é um problema frequente da produção leiteira, sendo o *S. aureus*, um dos mais importantes agentes etiológicos, veiculado pelo leite e derivados (Bandeira et al., 2013). Nader Filho et al. (2007) identificaram 72 isolados de *S. aureus* produtores de enterotoxinas provenientes de amostras de leite de vaca com mastite, em laticínios do estado de São Paulo. Mais de 90% (91,7%) apresentaram a capacidade de produzir pelo menos uma enterotoxina, sendo 52,8% de produzir SEA e SEB, 44% SED, 39% SEC e 37,5% TSST-1.

Akineden et al. (2001) identificaram *S. aureus* isolados de leite proveniente de vacas com mastite de oito fazendas de diferentes municípios alemães. A presença de genes que codificam as enterotoxinas SEA, SEC, SED, SEG, SEI e SEJ, indicaram que os genes encontrados no leite eram originários da infecção do úbere da vaca.

Nos Estados Unidos, Cenci-Goga et al. (2003) avaliaram o potencial enterotoxigênico de 160 cepas de *S. aureus* isoladas de leite proveniente de vacas com mastite e constataram que 22 cepas eram produtoras de enterotoxinas e dentre essas, sete produziram SEC, doze SED e três SEC e SED.

Arcuri et al. (2010) analisaram isolados de *S. aureus* de leite de vaca com mastite, amostras de leite de tanques e de queijos tipo Minas frescal dos principais laticínios inspecionados da região de Minas Gerais e Rio de Janeiro. As cepas de *S. aureus* foram caracterizadas por PCR *femA* e PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis*). Cerca de 14% dos 125 isolados de leite foram positivos para um ou mais genes de enterotoxinas entre *sea-see*, *seg*, *seh*, *sei* e *selj* e *sell*, o mesmo ocorreu para 43% dos 96 isolados de leite de tanques e 73% dos 70 isolados de queijo.

### **1.5.2 A manipulação dos produtos lácteos e contaminação estafilocócica**

*S. aureus* coloniza a região anterior das narinas de 30 a 50% da população humana saudável e serve como reservatório para a disseminação do patógeno. Durante a manipulação de alimentos esse patógeno pode ser transferido pelo hábito de coçar o nariz ou diretamente pelas mãos (Wattinger, et al., 2012; Udo, et al., 2009). Alguns estudos mostram o mesmo perfil genético das cepas encontradas em manipuladores de leite e derivados. André et al. (2008) encontraram que 75% dos manipuladores de um laticínio do estado de Goiás colonizavam *S. aureus* nas mãos e nariz, e mais de 65% das cento e quarenta amostras de leite e queijo apresentavam esta bactéria. O perfil do teste de heterogeneidade de DNA revelou diferentes clones entre os mesmos manipuladores. As cepas isoladas do leite apresentaram semelhança com as dos queijos em 23% dos casos e as cepas isoladas dos queijos foram diferentes das dos manipuladores, indicando a possibilidade de contaminação proveniente de outros laticínios, ambiente e pessoas. Entre as cepas de *S. aureus*, 23% foram resistentes a pelo menos um antibiótico (eritromicina, tetraciclina, oxacilina ou penicilina), mas todos apresentaram sensibilidade a vancomicina, gentamicina e ciprofloxacina.

Tondo et al. (2000) analisaram amostras de leite cru, produtos de leite, *swab* de equipamentos e fossas nasais de manipuladores, coletados durante dois anos e meio, em um laticínio de Nova Petrópolis (RS). Cepas de *S. aureus* foram isoladas de 35,2% dos 51 manipuladores investigados e 90,4% das 91 amostras de leite cru estavam contaminadas. Não foi isolado *S. aureus* das 145 amostras de

equipamentos dos laticínios analisadas. Das 3.200 amostras de produtos lácteos analisados, 10 apresentaram o patógeno (um queijo cheddar, uma manteiga, um creme de leite e quatro queijos frescos). Testes de susceptibilidade a antibiótico mostraram perfis similares entre o leite cru e os produtos lácteos, indicado ser o primeiro a fonte de contaminação.

A contaminação de leite e seus derivados pode ser prevenida no processo de ordenha e produção de leite para prevenir a mastite, nas instalações industriais para identificar os pontos críticos das etapas de produção; e na proteção e cuidado com sua saúde dos manipuladores (Osaili et al., 2013). Na indústria, o uso de culturas lácticas na produção de queijos pode inibir o crescimento de *S. aureus* (Alomar et al., 2008; Chioda et al., 2007; Kamdem, et al., 2008). As primeiras 24 horas da produção dos queijos são imprescindíveis para o controle do pH, temperatura e da flora antagonista, pois é quando a população de *S. aureus* atinge seu máximo, mantendo-se ou reduzindo em até 30 dias (Alomar et al., 2008). Entretanto, o controle de temperatura é o principal fator para o crescimento e produção de enterotoxinas estafilocócicas (Lindqvist, et al., 2002; Fugikawa, 2006, Lindqvist, 2006; Rho; Schaffner, 2007; Heidinger et al., 2009; Yoon et al., 2011; Tsutsuura, Murata, 2013).

## 1.6 MODELOS MATEMÁTICOS DE MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A microbiologia preditiva é um campo da ciência que se caracteriza pelo conhecimento do comportamento dos micro-organismos (crescimento, inativação e sobrevivência) em produtos alimentícios. Esta ferramenta utiliza modelos matemáticos e tem como objetivo avaliar a qualidade dos alimentos e garantir a segurança alimentar (McMeekin, Ross, 2002, McMeekin et al., 2010). A microbiologia preditiva pode ser utilizada na inovação e desenvolvimento de novos produtos, com acesso rápido dos parâmetros de crescimento bacteriano em diferentes formulações, condições de estocagem, e tempo de vida útil, auxiliando no processo de tomada de decisões (McMeekin, Ross, 2002; Membré, Lambert, 2008).

Os modelos matemáticos utilizados na microbiologia preditiva podem ser classificados em primários, secundários e terciários. Os modelos primários

descrevem a evolução do número dos micro-organismos ao longo do tempo e são usados para obter os parâmetros cinéticos a partir das curvas de crescimento microbiano, a taxa específica de crescimento (*specific growth rate*,  $\mu$ ), e a duração da fase lag ( $\lambda$ ). Adicionalmente estes modelos podem estimar a densidade máxima da população (DMP). A fase lag pode ser conceituada como uma adaptação do micro-organismo em resposta a uma mudança no ambiente, antes de iniciar o crescimento exponencial (Swinne et al., 2004). Os modelos secundários relacionam esses dois parâmetros à variação de outros fatores, como exemplo, a temperatura (T), atividade de água ( $a_w$ ) e pH (Baranyi, Roberts, 1994; Swinne et al., 2004).

Os modelos terciários, apresentados em softwares, são construídos a partir de modelos primários e secundários validados capazes de simular as condições de crescimento e inativação do micro-organismo (Ross et al., 1999; Baranyi, Tamplim, 2004). Esses modelos têm exibido alta acurácia em prever comportamento microbiano em condições diversas (Pouillot, Lubran, 2011). Os programas que disponibilizam modelos terciários são *online* e grátis, disponíveis na internet por login, e os principais são o Pathogen Modeling Program (PMP; [www.arserrc.gov/mfs/pathogen.htm](http://www.arserrc.gov/mfs/pathogen.htm)) e o *ComBase Predictor* ([www.combase.cc](http://www.combase.cc)).

As variáveis do PMP incluem a condição atmosférica (aeróbico, anaeróbico), temperatura (constante), pH, atividade de água ( $a_w$ ), e nitrito de sódio para *S. aureus*. É um modelo de predição de crescimento em meio de cultura, tipo caldo, esterilizado, e obedece a equação de modificada Gompertz (Eq. 1.1, McMeedin et al., 1993; e Buchanan, 1993).

$$\text{Log}N(t) = A + C \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad (\text{Eq. 1.1})$$

Onde,

$N(t)$  = densidade da população no tempo  $t$

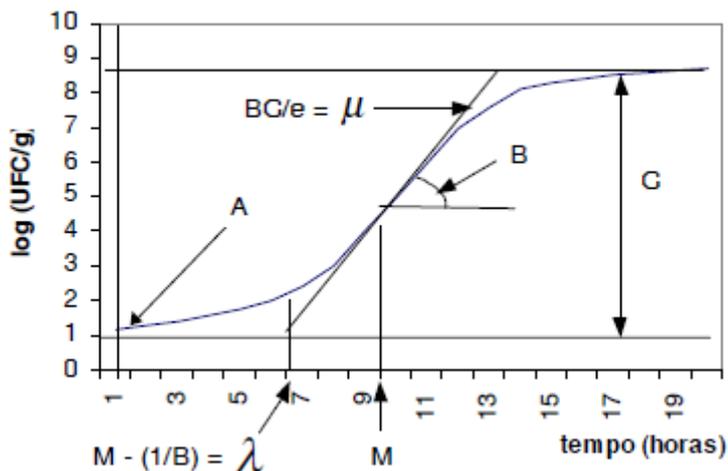
$A$  = valor da assíntota inferior, isto é,  $\log N(-\infty)$  (equivalente ao log do número inicial de bactérias)

$C$  = valor da assíntota superior, isto é,  $\log N(+\infty)$  (equivalente ao log da densidade máxima da população durante a fase estacionária menos o log da contagem inicial)

$M$  = tempo no qual a velocidade de crescimento absoluta é máxima

$B$  = velocidade de crescimento relativa no tempo  $M$ .

A Figura 1.3 mostra graficamente os parâmetros previstos na equação modificada de Gompertz. Esta equação possui algumas limitações, principalmente a falta de linearidade da reta ( $\log$  UFC/mL) durante a fase de crescimento exponencial, normalmente observado na maioria das curvas de crescimento. Como a velocidade de crescimento ( $\mu$ ) é determinada por um ponto de inflexão na curva, sua estimativa pode variar consideravelmente de acordo com os ajustes da equação.



**Figura 1.3** Parâmetros associados com a equação modificada de Gompertz, utilizado no modelo PMP;  $\mu$  = velocidade ou taxa de crescimento,  $\lambda$  = fase lag (Buchanan, 1993)

O ComBase, lançado em 2004, inclui modelos de crescimento (*Access Growth model*), de inativação térmica (*Access thermal Inactivation model*) e de sobrevivência não-térmica (*Access Non-thermal survive*). Adicionalmente, possui modelos específicos para *Clostridium perfringens* (Perfringens Predictor) e *Salmonella* sorovar Typhimurium DT104 em ovo (*Salmonella in egg*). Estes modelos usam aproximadamente 30.000 curvas de crescimento geradas *in vitro* sob diferentes condições ambientais. Para *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Shigella flexneri*, e *Yersina enterocolitica*, é possível obter curvas de crescimento considerando níveis de nitrito,  $\text{CO}_2$ , ácido lático e/ou ácido acético (ComBase Predictor 2.0 User Manual; Baranyi, Tamplin, 2004). O Combase utiliza a equação de Baranyi (Baranyi, Roberts, 1994), que resolveu algumas das limitações encontradas na equação modificada de Gompertz. Nesse modelo, a fase lag

observada é uma combinação do estado fisiológico das células ( $q_0$ ) e da razão  $\nu$ , que determina a velocidade de transição da fase lag para a fase exponencial (Eq. 1.2). Se  $\nu$  é pequeno, então a fase lag pode ser longa.

$$\lambda = \frac{\ln(1 + 1/q_0)}{\nu} \quad (\text{Eq. 1.2})$$

### 1.6.1 Predição de variável por redes neurais artificiais

Redes neurais artificiais é uma ferramenta matemática capaz de aproximar qualquer relação subjacente entre a variável dependente e independente com robustez, com habilidade de lidar com alta variabilidade biológica e incerteza associada com o crescimento de micro-organismos (Najjar, et al., 1997). As redes neurais foram inspiradas na estrutura do cérebro, da mesma forma que as regressões lineares são usadas para aproximação de funções, e da mesma forma que análises discriminantes e regressões logísticas são usadas para classificação ou agrupamento. A vantagem das redes neurais é que são capazes de modelar funções extremamente complexas, e atualmente existe uma grande variedade de algoritmos sofisticados para treinamento de redes neurais, o que as torna uma alternativa mais interessante do que os métodos convencionais (Braga et al., 2007).

O treinamento da rede é o processo de ajuste fino dos parâmetros de cálculo, com a finalidade de fazer com que a rede produza *outputs* (saída) com valores aproximadamente corretos para os *inputs* (entrada) fornecidos. Esse processo é baseado no algoritmo de treinamento, que seleciona diversos conjuntos de parâmetros de cálculo e avalia cada conjunto com o objetivo de determinar a melhor função de predição. Cada conjunto de parâmetros é uma “tentativa”, e o software permite até 1000.000 tentativas até que o menor erro é atingido (Manual@risk).

A versão NeuralTools do pacote @risk suíte Palisade® oferece as redes *Multi-Layer Feedforward* (MLF), de multi-camadas, redes neurais artificiais de Regressão Generalizada e Redes Neurais Probabilísticas (RNP). A regressão generalizada utiliza valores numéricos e a probabilísticas valores categóricos. O RNP

é um software amigável, e pode ser usado para predições onde não conhecemos a relação entre as variáveis (Manual @risk).

## 1.7 AVALIAÇÃO DO RISCO MICROBIOLÓGICO

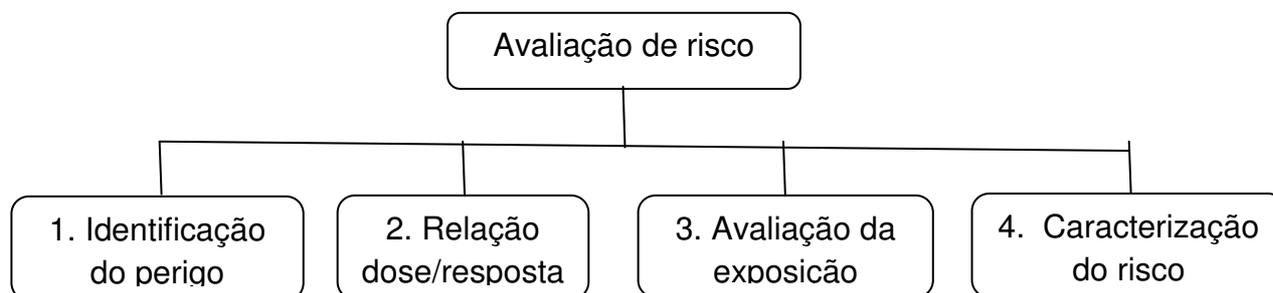
A eliminação total dos patógenos no meio ambiente e nos alimentos é impossível, no entanto, é possível a adoção de medidas adequadas para garantir o seu controle a um nível aceitável. No âmbito nacional, países podem estabelecer tais níveis, que possuem relação com indicadores de saúde pública, como por exemplo, o número de casos de DTA/100.000 habitantes, a probabilidade de ocorrência de um efeito adverso, o número máximo de uma bactéria patogênica em um alimento ou uma taxa de ataque específica para um patógeno. Esses níveis são definidos como nível apropriado de proteção ou *Appropriate Level of Protection (ALOP)*. Sempre que possível, a determinação do ALOP deve ser baseada em fatores científicos e sociais e, deve-se considerar os custos industriais para reformulação e mudanças no processamento, custos para o consumidor decorrentes do aumento de preço ou redução da disponibilidade de certos alimentos, custos regulatórios em termos de vigilância e a fundamentação científica do nível de proteção pretendido (ICMSF, 2006; ILSI, 2007; Sant'Ana, Franco, 2009).

Para que o governo atinja um ALOP, as metas de inocuidade de alimentos precisam ser transformadas em parâmetros que possam ser utilizados pelos produtores no processamento de alimentos. O objetivo de inocuidade alimentar (*Food Safety Objective, FSO*) é o nível ou frequência máxima do perigo no produto final que será disponibilizado para o consumidor, e o objetivo de desempenho (*Performance Objective, PO*) é a frequência ou concentração máxima do perigo no alimento em uma etapa específica da cadeia alimentar que contribua para alcançar o FSO estabelecido. O critério microbiológico (*Microbiological criteria, MC*) define a aceitabilidade do produto baseado na presença/ausência ou número de micro-organismos (e/ou toxinas) por unidade de volume, massa, área ou lote, considerando o plano de amostragem, a unidade analítica e método analítico, e a concentração máxima em número de unidades analíticas/total de amostras analisadas (Cordier, 2004; Gorris, 2004).

O *Codex Alimentarius* é um fórum internacional de normatização do comércio de alimentos estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU), por ato da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial de Saúde (OMS). Criado em 1963, tem a finalidade de proteger a saúde dos consumidores e assegurar práticas equitativas no comércio regional e internacional de alimentos. Para efeito do comércio internacional sem prejuízos à inocuidade dos alimentos, o Codex adotou a análise de risco como ferramenta para alcançar o ALOP e demais parâmetros (FAO/WHO, 2006; Figueiredo, Miranda, 2011).

Os componentes da análise de risco são Avaliação de Risco, Gerenciamento do risco e Comunicação do risco. A avaliação de risco envolve de quatro etapas: 1) a identificação do perigo biológico; 2) a caracterização do perigo ou dose-resposta; 3) a avaliação da exposição e; 4) a caracterização do risco (Figura 1.5). Em geral a separação das decisões de gestor e avaliador de risco deve tornar o processo mais imparcial. Porém, a interação é necessária para a compreensão sistemática do problema, ao mesmo tempo em que elege os riscos mais importantes e estabelece políticas de avaliação de risco junto ao gerenciador do risco, mantendo o caráter transparente do processo (CAC, 1999; Figueiredo, Miranda 2011). A troca de informações sobre o risco entre avaliadores, gerenciadores, mídia, grupos de interesse e público em geral se dá no âmbito da *comunicação de risco* (Jardim, Caldas, 2009; Figueiredo, Miranda, 2011). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o gerenciador nacional de riscos e age no monitoramento de perigos por meio dos programas nacionais de vigilância sanitária e programas estaduais, municipais e do Distrito Federal os quais fortalecem o sistema nacional de vigilância sanitária.

A avaliação de risco microbiológico (ARM) é um processo técnico-científico que objetiva acessar a probabilidade de um risco de efeito adverso associado a uma exposição alimentar baseada em dados laboratoriais brutos ou publicados da indústria, de vigilância, universidades ou dados epidemiológicos nacionais ou internacionais que interessam em maior ou menor grau a saúde pública que deve gerenciá-lo (OPAS, 2008).



**Figura 1.4** Etapas da avaliação de risco

### 1.7.1 Identificação do perigo

A Identificação do perigo microbiológico tem como objetivo a identificação dos micro-organismos ou toxinas que causam doenças por meio do consumo de alimentos, a definição da combinação patógeno/alimento ou identificação do problema de segurança alimentar. É um processo predominantemente qualitativo, e as informações podem ser obtidas da literatura científica, banco de dados produzidos pela indústria de alimentos, dados de incidência de hospitais, clínicas e postos de saúde, institutos de referência em saúde e pesquisa, e dados epidemiológicos (diagnósticos clínico-laboratoriais, taxa de ataque, incidência das doenças na população e se disponível, subpopulação). Adicionalmente, informações obtidas pela vigilância sanitária também podem auxiliar nesta etapa, incluindo problemas ou riscos observados durante inspeções rotineiras, problemas observados numa série histórica de um período anual alimentado pelos programas de monitoramento microbiológico e que precisa ser avaliado quanto a possibilidade da percepção de risco ser factível ou não (CAC, 1999; Hugas et al., 2007; OPAS, 2008).

Dois programas de monitoramento da ANVISA fornecem dados que auxiliam na identificação de um perigo alvo para condução de ARM. O Programa de Análise de resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal

(PAMVET) e o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF). Os resultados iniciais deste último programa indicaram a presença de 18 sorovares de *Salmonella*: *S. Enteritidis* (48,8%), *S. Infantis* (7,6%), *S. Typhimurium* (7,2%), *S. Heidelberg* (6,4%), *S. Mbandaka* (4,8%) e outros sorovars (25,2%). Foram testados 18 antibióticos quanto ao perfil de suscetibilidade (sensível, intermediário e resistente) e a totalidade das cepas apresentou resistência a uma ou mais drogas (OPAS, 2006)

Uma vez que se tem a iniciativa de fazer ARM, é importante definir quanto detalhe será incorporado para acessar a resposta ao questionamento que incitou a avaliação. Devido às necessidades dos diferentes gestores de saúde pública, os quais são influenciados pelos interesses políticos e da sociedade, a ARM não tem necessariamente um modelo restrito (*one-size-fits-all*). As diretrizes prevêem métodos flexíveis para diferentes tipos de avaliação ou problema (CAC, 1999; EPA, 2012).

### **1.7.2 Caracterização do perigo ou dose-resposta**

Nesta etapa é feita a constatação qualitativa ou quantitativa do efeito adverso resultante da ingestão de um micro-organismo ou toxina no alimento. As fontes de caracterização do perigo podem ser dados clínicos de atendimento médico, dados epidemiológicos, estudos toxicológicos com modelos animais e em seres-humanos e estudos *in vitro* (OPAS, 2008). Esta etapa inclui a descrição da patogenicidade do perigo na exposição oral, capacidade de transferir material genético entre espécies, como genes de resistência antibiótica ou característica fenotípica de resistência antibiótica, período de incubação e início dos sintomas, capacidade de persistência no organismo humano com colonização assintomática e retransmissão, descrição das características (pH e %NaCl) e do preparo (manipulação intensa) do alimento que podem afetar a possibilidade de infecção ou toxinfecção (FAO/WHO, 2006).

A relação dose-resposta em microbiologia tem a função de determinar uma dose infectante (DI) predita necessária para causar uma infecção ou doença num percentual da população. Ela é estimada a partir de estudos com voluntários ou

dados de surtos, para estimar o número de casos e o risco relativo numa dada população (Buchanam, Long, 2000; Todd et al., 2008).

Os estudos com voluntários são limitados, pois seu delineamento envolve na maioria das vezes, adultos, homens, saudáveis, de número pequeno, com características étnicas definidas, sem elucidação da interação entre o patógeno e o organismo hospedeiro. Em geral, são conduzidos junto a testes de vacinas e por isso em altas doses do patógeno (Haas, et al., 1996; Buchanam, Long, 2000; Todd et al., 2008). Holcomb et al. (1999) descreveram estudos de dose-resposta usando diferentes modelos matemáticos para os patógenos *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella Typhi*, e *Campylobacter jejuni* em sujeitos adultos saudáveis que ingeriram leite com suspensão dos micro-organismos.

Modelos estatísticos usados nos estudos de dose-resposta incluem o *Beta-Poisson* (Haas, 1983; Haas et al., 1993; Haas et al., 1996; Crockett et al., 1996), o Weibull-Gamma, usado por Farber et al. (1996) para estimar a DI de *L. monocytogenes*, e o modelo exponencial, usado por Rose et al., (1991) no sistema giárdia em água. Estudos em voluntários não são permitidos para *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e enterohemorrágica (EHEC) pela severidade da doença, mas estima-se que poucas células são necessárias para causar doença (entre 10 - 100 UFC) (Buchanam, Long, 2000; Todd et al., 2008).

Grande parte dos modelos de ajuste dos dados de estudos de dose-resposta em voluntários usa a premissa do modelo *single-hit*. Nesse modelo, se os patógenos resistiram às barreiras do ácido gástrico e da membrana epitelial e às imunodefesas do hospedeiro para alcançar e colonizar o intestino, é certo que uma única célula pode ter sobrevivido com capacidade de reproduzir-se e produzir uma infecção ativa. Esta premissa pode explicar os surtos de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis, *Shigella* e *L. monocytogenes* onde os níveis dos patógenos foram extremamente baixos (Buchanam, Long 2000). *Shigella* possui a probabilidade de causar infecção de 0,005, isto é, se 1000 pessoas consumirem uma célula, cinco serão infectadas (Crockett et al., 1996). Sendo assim, a probabilidade de adoecer aumenta conforme o nível do patógeno. Adicionalmente, a probabilidade da doença pode ter a influência da defesa do organismo, proporcionalmente ao crescimento, e aí ela diminui com a dose.

Não existe relação dose-resposta para *S. aureus*, mas sua patogenicidade é estabelecida em função da ingestão de enterotoxinas termoestáveis pré-formadas no alimento quando o nível de contaminação é  $\geq 10^5$  (Tenover et al., 2008; Todd et al., 2008; Todd et al., 2009; Udo et al., 2009; FDA/Bad Bug Book, 2012; Wattering, et al., 2012). A magnitude da intoxicação relaciona-se ao nível de enterotoxina ingerida pelos consumidores (Buchanan, Long, 2000, Argudin et al., 2011; Sospedra, et al., 2013). A Tabela 1.2 relaciona os estudos nos quais foram observadas as doses de enterotoxina necessárias para causarem intoxicação estafilocócica. As doses listadas causaram, pelo menos, um dos sintomas de intoxicação estafilocócica: vômito, diarreia, dor abdominal e síndrome do choque tóxico.

**Tabela 1.2** Menor dose de enterotoxina estafilocócica (SE) que causou infecção.

<b>Estudo</b>	<b>Surto/voluntários/cobaias</b>	<b>Dose de intoxicação</b>	<b>Tipo de SE</b>
Asao et al., (2003)	Surto (Japão)	20-100 ng	SEA
Bad Bug Book (FDA) (2012)	Não identificado	<1 µg ou 100-200 ng	SEA a SEE
Bergdoll (1988)	Macaco**	2-3 ng/kg pc	SEA
Evenson et al., (1988)	Surto	94-184 ng	SEA
Genigeorgis (1989)	Não identificado	$\geq 0,1\mu\text{g}$	SEA a SEE
Ministério da Saúde, BR (Brasil, 2012)	Não identificado	100 a 200 ng	SEA a SEE
Raj, Bergdoll, 1969	Voluntários	20-25 µg	SEB

Evenson et al. (1988), nos Estados Unidos estimaram que a dose que causou sintomas de intoxicação estafilocócica, foi de 94 a 184 ng por porção de leite achocolatado, consumido por estudantes entre 5-19 anos. No estudo de Raj, Bergdoll (1988) descreveu o estudo de exposição oral de filtrado purificado de enterotoxinas introduzidas por meio de tubo intragástrico em 30 macacos no qual resultou que a dose de SEA capaz de causar êmese em 50% ( $ED_{50}$ ) foi de 1000 ng/kg pc em macacos e 2-3 ng/kg pc em humanos. Bergdoll (1969), três voluntários (dois homens e uma mulher) foram expostos à SEB purificada dissolvida em água

destilada, que resultou numa dose infectante para homem de 20 a 25 µg de SEB com 50% de pureza por porção consumida por esses voluntários.

No Brasil, inexistem dados oficiais do Ministério da Saúde sobre detalhes de investigação epidemiológica que contemple a taxa de ataque (doentes/doentes + não doentes ou população de risco ou população de expostos), o risco relativo dos alimentos investigados e dados de detecção de toxina ou de células bacterianas em vômito ou fezes. Os artigos de investigação de surtos no Brasil não indicam nenhuma dose de resposta de dano, apenas descrevem concentrações de SEs nos alimentos suspeitos não apresentando correlações com os casos. Segundo a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública – CGLAB e a Coordenação de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica – CLVE do Ministério da Saúde, no Boletim de Vigilância Laboratorial das Enterotoxinas estafilocócicas, Informe nº3 de 2012, a quantidade de enterotoxina necessária para causar doença, está em torno de 100 a 200 ng.

### **1.7.3 Avaliação da exposição**

A exposição é avaliada considerando a ocorrência de um determinado patógeno em dado nível de contaminação no alimento, no momento do consumo, numa dada população e/ou subpopulação (OPAS, 2008; Stringer, 2005; FAO/WHO, 2008). Para acessar o nível de contaminação do patógeno no alimento no momento do consumo considera-se os fatores intrínsecos (pH, concentração salina, conservantes, acidulantes, micro-organismos deteriorantes, bactérias lácticas,  $a_w$ ) e extrínsecos como oxigênio, temperatura, contaminação cruzada e recontaminação (Reij e Shothorst, 2000; Buchanan, Long, 2000).

O cenário da exposição pode ser mais ou menos discriminado à medida que acumulamos informações demográficas como, idade, perfil socioeconômico, cultural hábitos alimentares, regionalidade, sazonalidade e comportamento. Para atribuição dos níveis de contaminação pode-se usar legislação que preconiza os critérios microbiológicos (MC), ou FSO de cada país, ou usar os dados de monitoramento de alimentos (OPAS, 2008; Stringer, 2005; FAO/WHO, 2008).

A exposição é dada em termos de dose na porção consumida (nível de contaminação do patógeno em estudo) numa dada frequência (anual, diária) de micro-organismos ou toxinas. A dose pode ser obtida na forma de distribuição estocástica usando simulação de Monte-Carlo, que possibilita verificar a incerteza da estimativa (Montville, Schaffner, 2005; Makita et al., 2012). A concentração é dada pela concentração do patógeno na unidade de medição, por exemplo, UFC/g.

#### 1.7.4 Caracterização do risco

A caracterização de risco integra as três etapas anteriores e visa estimar a possibilidade ou probabilidade da ocorrência de uma dose tóxica ou de um efeito adverso por meio de uma incidência de casos ou severidade (mortalidade e morbidade) numa dada população que consome o alimento específico (Rocourt et al., 2003; FAO/WHO, 2006; OPAS, 2008; EPA, 2012). Nesta etapa compara-se a dose de exposição estimada na etapa anterior com a dose considerada tóxica. Risco pode existir quando a dose estimada é igual ou maior que a dose tóxica. Quando este risco é determinado em termos quantitativos, temos a avaliação quantitativa do risco microbiológico (AQRM).

O Quadro 1.1 sumariza alguns estudos de avaliação de risco microbiológico conduzidos no Brasil e em outros países.

**Quadro 1.1** Estudos de avaliação de risco microbiológico

<b>Estudo/País</b>	<b>Combinação patógeno/alimento</b>	<b>Caracterização do risco: % ou número de casos da doença.</b>
Whiting, Buchamam, 1997 (EUA)	<i>Salmonella</i> enteritidis em ovo líquido em molho de maionese	Risco de $10^{-11}$ ou quase zero.
Bemha et al., 1998 (França)	<i>Listeria monocytogenes</i> em queijo feito de leite cru	Risco baixo de 0-3 casos/ano, e alto risco de 3-25 casos/ano .
Lindqvist, Westöö, 2000 (Suécia)	<i>Listeria monocytogenes</i> em salmão defumado	Risco de $4 \times 10^{-4}$ /porção no modelo I e; $2,8 \times 10^{-5}$ (baixo risco) e 0,016, no modelo II.
Bemha et al., 2003 (França)	<i>Salmonella</i> em <i>Cordon Bleu</i> , prato à base de carne de peru, servidos em estabelecimentos de catering	Risco de 2 casos/5000 refeições servidas

Estudo/País	Combinação patógeno/alimento	Caracterização do risco: % ou número de casos da doença.
Rosenquist et al., 2003 (Dinamarca)	Frango com <i>Campylobacter</i> (desde o abate até o preparo)	Risco de 14.000 casos/ano
Crépet et al., 2007 (França)	<i>L. monocytogenes</i> em hortaliças frescas minimamente processadas	Risco de 1,44% de conter 1 log UFC/g; 0,63% de 2 log UFC/g e 0,17% de conter 3 log UFC/g.
Sant'Ana, 2011 (Brasil)	<i>Salmonella</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> em vegetais minimamente processados	Maior risco de <i>Salmonella</i> de $4,3 \times 10^{-2}$ e de <i>L. monocytogenes</i> de $5,9 \times 10^{-9}$ , no 95 percentil.
Stewart et al., 2003 (EUA)	<i>S. aureus</i> em produto de panificação recheado com creme	Risco de 43 casos/ $10^6$ pessoas entre os anos de 1977-1981
Bahk et al., 2006 (Coréia)	<i>S. aureus</i> em alimento Kimbab (sushi típico da Coréia)	Risco dado pela frequência de 29,2% das porções com nível de contaminação $\geq 5$ log UFC/g
Rho, Schaffner, 2007 (Coréia)	<i>S. aureus</i> em alimento Kimbab (sushi típico da Coréia)	Risco zero até 1 hora após o preparo, menor que 5 log UFC/g de nível de contaminação.
Lee, Park, 2008 (Coréia)	<i>S. aureus</i> em salada de radiche	Risco zero quando estocada a temperatura $< 15^\circ\text{C}$ por 3-5 horas.
Kim et al., 2009 (Coréia)	<i>S. aureus</i> em carne de porco cozida	Risco $< 1,46 \times 10^{-4}$ de 20ng/porção, no 99% percentil
Ross, et al., 2009 (Austrália)	<i>Listeria monocytogenes</i> em patês, salsicha cozida e carne processada	Risco de 1 (uma) célula/porção consumida dos produtos, variou entre $10^{-13,4}$ e $10^{-14,2}$
Yoon et al., 2011 (Coréia)	<i>S. aureus</i> em alimento Kimbab (sushi típico da Coréia)	Risco zero de nível de contaminação considerada toxigênica entre $10^6$ a $4 \times 10^7$ UFC/g.
Murmann et al., 2011 (Brasil)	<i>Salmonella</i> em linguiça de churrasco, em Porto Alegre	Risco zero de doença com cozimento à $75,7^\circ\text{C}/19'$ .
Lindqvist et al., 2002 (Suécia)	<i>S. aureus</i> em queijo fresco de leite cru	Risco de $5 \times 10^{-3}$ em (queijo, pH 5,2) e $3 \times 10^{-2}$ (pH, 6,5)
Makita et al., 2012 (Etiópia)	<i>S. aureus</i> em leite cru	Risco de $1 \times 10^{-2}$ de dose de 100 ng em 500 mL de leite

### 1.7.5 Gestão do risco

Os resultados da ARM devem ser utilizados pelo gestor do risco a fim de adotar medidas de mitigação para a combinação patógeno/alimento ou utilizar o risco estimado para ressaltar o sucesso dos programas de vigilância e manter o

ALOP. Medidas de mitigação de risco incluem a reavaliação dos parâmetros microbiológicos, rigorosidade nas inspeções, aumento do número de amostras monitoradas, políticas de saúde de incentivo as capacitações e interdição de estabelecimentos produtores. No caso de risco iminente à saúde, pode ocorrer a proibição de fabricação, importação, distribuição e comercialização de produtos. No âmbito internacional, o *Codex Alimentarius* utiliza os estudos de ARM conduzidos pelo comitê científico da OMS e FAO para subsidiar o estabelecimento e revisão de seus padrões alimentares (FAO/WHO, 2006).

### **1.7.6 Comunicação de risco**

Comunicação de risco é definida como a troca interativa de informação e opinião entre avaliadores, gestores, consumidores, indústria, comunidade acadêmica e outras partes interessadas relacionadas aos fatores de risco e sua percepção. Esse processo, realizado ao longo de toda a análise de risco, os avaliadores de risco devem explicar seus achados, e os gestores de risco a base de suas decisões (FAO, 2006).

Quando a questão de segurança alimentar é menos urgente, a comunicação eficiente entre todos os participantes da análise de risco leva a uma melhora na qualidade das decisões de gestão, principalmente porque agrega dados científicos, opiniões e perspectivas de todas as partes interessadas. Numa situação de emergência, uma comunicação eficiente entre os avaliadores, cientistas e o gestor, bem como estas partes e outras interessadas e o público em geral é crítico para auxiliá-las as pessoas a compreender os riscos e tomar decisões apropriadas (FAO, 2006).

## OBJETIVOS

### Geral

Fazer um levantamento da qualidade microbiológica de alimentos prontos para o consumo no Distrito Federal e conduzir um estudo de avaliação de risco quantitativo da exposição da população brasileira à *Staphylococcus aureus* pelo consumo de queijo tipo Minas frescal.

### Específicos

- Avaliar os laudos de análise de alimentos prontos para o consumo emitidos pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF) no período 2000-2010;
- Identificar a prevalência dos alimentos contaminados e os perigos microbiológicos nos alimentos consumidos no Distrito Federal;
- Avaliar os dados de investigação epidemiológica de surtos alimentares no Distrito Federal;
- Identificar a combinação alimento/perigo biológico para efeito de avaliação de risco microbiológico;
- Implementar um modelo de predição de risco de contaminação de *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de queijo tipo Minas frescal por rede neural artificial;
- Avaliar a exposição oral ou dose de enterotoxina A estafilocócica pelo consumo de queijo tipo Minas frescal;
- Estimar o risco da probabilidade de intoxicação por enterotoxina A estafilocócica pelo consumo de queijo tipo Minas frescal.

## **CAPÍTULO II – INVESTIGATION OF FOOD AND WATER MICROBIOLOGICAL CONDITIONS AND FOODBORNE DISEASE OUTBREAKS IN THE FEDERAL DISTRICT, BRAZIL**

O presente capítulo descreve as etapas realizadas para atingir os três primeiros objetivos do estudo em questão, a saber:

- avaliar os laudos de análise de alimentos prontos para o consumo emitidos pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF) no período 2000-2010;
- identificar a prevalência dos alimentos contaminados e os perigos microbiológicos nos alimentos consumidos no Distrito Federal;
- avaliar os dados de investigação epidemiológica de surtos alimentares ocorridos no Distrito Federal.

Os resultados das referidas etapas foram reportados no artigo *Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, Brazil*, publicado em 2013 na revista *Food Control*, transcrito a seguir, e apresentado na sua forma original, conforme Anexo A.

## Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, Brazil

Márcia Menezes Nunes<sup>1</sup>, Ana Lourdes Arrais de Alencar Mota<sup>2</sup>, Eloisa Dutra Caldas<sup>3</sup>

1. Federal District Health Secretariat, Brasilia, DF, Brazil; 2. Laboratory of Veterinary Epidemiology, University of Brasília, Brasilia, DF, Brazil, 3. Laboratory of Toxicology, University of Brasília, Campus Darci Ribeiro, 70910-900 Brasília, DF, Brazil.

Food Control, 34 (2013) 235-240

### Abstract

This is a retrospective study describing data on the microbiological conditions of food and water obtained from analysis reports issued by the Central Laboratory of the Federal District (LACEN-DF), and information on foodborne disease outbreaks investigated by the Office of Water and Food Borne Diseases of the Federal District (NATHA), Brazil, between 2000 and 2010. A total of 4,576 analysis reports were evaluated, from which 92.9% of monitoring samples and 7.1% of samples suspected to be involved in outbreaks. Of the total number of samples, 630 did not comply with Brazilian legislation (rejected). Ready-to-eat food, milk/dairy products, water, spices/seasonings, and ice cream/sorbets had the highest rejection rates among the monitoring samples (18.9 to 11%), with the first two groups having the highest rates of the outbreak samples (21.7 and 23.5%). *Minas* cheese showed to be the food with the highest rejection rate among the samples analyzed by the LACEN-DF. About 9% of the food samples were rejected due to thermotolerant coliforms and/or coagulase-positive staphylococci, and 10.5% of the water samples were rejected due to *Pseudomonas aeruginosa*. Ready-to-eat food were the main foods involved in the foodborne disease outbreaks investigated by NATHA (51.3% of the 117 outbreaks with the food identified) and *Bacillus cereus* the most identified etiologic agent (41.2% of the 80 outbreaks with the agent identified). This study indicated that microbiological surveillance programs should focus on ready-to-eat food to prevent the occurrence of foodborne disease outbreaks in the region.

## **Introduction**

Food and water represent important vehicles for pathogens of substantial public health concern, including those that cause acute diarrheal illnesses, which account for 1.8 million childhood deaths annually, predominantly in developing countries (WHO, 2008). About 4.3 million cases of acute diarrhea were reported in 2010 in Brazil, with almost 4,000 deaths (MS, 2012a).

Over 8,500 foodborne disease outbreaks were reported by local/state health authorities to the Brazilian Foodborne Disease Outbreak Surveillance System between 2000 and 2010, involving nearly 180,000 individuals and 88 deaths (MS, 2012b). In 2011, the reporting of foodborne disease outbreaks became compulsory in the country, but only for outbreaks occurring on ships or aircraft (Regulation 104/2011, Brazilian Ministry of Health).

In addition to laboratory data on sick individuals and disease reports, microbiological analyses of the suspected food items may contribute to the investigation of outbreaks of foodborne diseases (WHO, 2008; Oliveira et al., 2010). In Brazil, state laboratories are responsible for conducting analyses of food available for consumption in routine sanitary surveillance programs, and of food suspected of involvement in foodborne disease outbreaks. This information may be used by health authorities and food industry professionals to target prevention efforts against pathogens and foods that cause the outbreaks.

The objective of the present study was to identify the critical biological hazards and the associated foods consumed in the Federal District of Brazil, based on food microbiological analyses and epidemiological data of foodborne disease outbreaks that occurred in the region from 2000 to 2010. Covering a total area of 5,801,937 km<sup>2</sup>, the Federal District is in the Midwestern region of Brazil, where the nation's capital, Brasilia, is located. In 2009, the estimated population of the Federal District was about 2.6 million inhabitants.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Microbiological analysis reports**

This is retrospective registry-based descriptive study covering data collected from microbiological analysis reports of samples of food ready for consumption

(requiring no further thermal processes before consumption) and water analyzed by the Central Laboratory of the Federal District (LACEN-DF) between 2000 and 2010. The samples were classified by the LACEN-DF as monitoring samples (under its Sanitary Surveillance Program) or as outbreak samples (suspected of involvement in a foodborne disease outbreak). The surveillance program samples were randomly collected (non-statistical sampling) from various commercial establishments, including supermarkets, restaurants, catering services and bakeries. The microbiological analyses of all samples were conducted using standard methodologies (APHA, 2001; MAPA, 2003) and included the following cultural analyses: Mesophilic aerobic count (MAC), coliforms, coliforms at 30°C, thermotolerant coliforms (TTC), coagulase-positive staphylococci (CPS), *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterococcus* spp. In this study, the food products analyzed by the LACEN-DF were classified into food groups, as shown in Table 1.

The conclusions of the analyses were described in the reports as being either compliant or non-compliant with the microbiological parameters established for food samples by Directive 451/1997 (published by the Brazilian Ministry of Health, in effect until December 2000) and Resolution 12/2001 (published by the National Sanitary Surveillance Agency, ANVISA), and by Resolutions 54/2000 and 275/2005 (ANVISA) for bottled water samples. Samples that were non-compliant with legislation were regarded in this work as rejected samples. In addition to the parameters established by legislation, the results of the outbreak samples analyzed by the LACEN-DF were compared with the infectious dose (ID) of detected pathogenic microorganisms ( $10^5$  CFU/g or mL for *S. aureus* and *B. cereus*) (FDA, 2012). Staphylococcal enterotoxin investigation was conducted in four outbreak samples using the RAPD technique (Random amplified polymorphic DNA), followed by Optimum Sensitivity Plate for strain identification (SEA, SED and TSSH-1).

**Table 1.** Food groups and food items analyzed by the LACEN-DF

<b>Food group</b>	<b>Food</b>
Milk and dairy products	Milk (UHT, pasteurized, fermented and powder); cheese (mozzarella, <i>minas</i> , provolone, Roquefort, parmesan, cottage, brie, <i>coalho</i> ); milk cream (fresh and canned); <i>doce de leite</i> ; powder for milky beverages; fruit yogurts; butter.
Ready-to-eat food (from catering establishments, restaurants and bars)	Meals containing rice, beans, vegetables, chicken, cattle, lamb, pork, fish and/or seafood; salmon sashimi; baked and fried <i>salgados</i> (with fillings of chicken or cattle meat, ham, cheese and/or shrimp); paste (garlic, tuna, chicken, chickpea, cheddar, ham, salmon, garlic); pasta with various sauces; vegetable salad; potato salad with mayonnaise; potato pure; <i>pamonha</i> ; hotdogs; sandwiches; pizza; cakes, puddings.
Water	Mineral water, purified water with salts, ice cubes, bottled water
Spices, seasonings, condiments	Salt based condiments; black pepper (powder/ground and whole peppercorns); dried seasonings (curry, oregano, saffron, curcuma, cinnamon, basil), dried garlic; mayonnaise; mustard; ketchup; refined and brown sugar.
Fruit and vegetables, raw or canned	Canned (sweet corn, olive, pea, carrots, eggplant, summer squash, various fruits); fresh fruits and vegetables; minimally processed vegetables; vegetable oil; margarine.
Non-alcoholic beverages	Soft drinks; frozen fruit pulp; concentrated fruit juice; fruit juice ready for consumption; nectars.
Flour, cereals, cakes, industrialized	Corn starch and flour; wheat flour; oat meal and flour; cereal bran; cereal bars; cereal flakes; cookies, crackers; cakes; cake powder.
Ice cream and sorbets	Ice cream and sorbets of various flavors and fruits
Animal products, processed, and eggs	Canned (sardine, tuna, minced meat in tomato sauce, <i>mocotó</i> ); liver paste; sausages; ham (pork, turkey; chicken); mortadella; eggs (quail and chicken); honey.
Snacks and appetizers	Corn snacks of various flavors; potato chips.
Babyfood	Infant formula (up to 1 year old)
Chocolates, candies, sweets	Chocolate, candies, confectionary, candies enrobed in chocolate; vegetable and fruit sweet (such as <i>bananada</i> and <i>goiabada</i> )

## 2.2. Foodborne disease outbreak information

Information on foodborne disease outbreaks that took place in the Federal District between 2000 and 2010 were obtained from the Office of Water and Food Borne Diseases (NATHA) of the Epidemiology Department of the Federal District Health Secretariat. Information obtained for each investigated outbreak included the food involved, the etiological agent identified in the food sample and/or the biological sample, number of cases, and age and sex of the individuals affected. Some reports also included the criterion used to conclude the outbreak: laboratory-confirmed, food

analysis, laboratory-confirmed/food analysis or clinical-epidemiological, which includes information on symptoms, dietary habits and existence of family members or other consumers with the same symptoms.

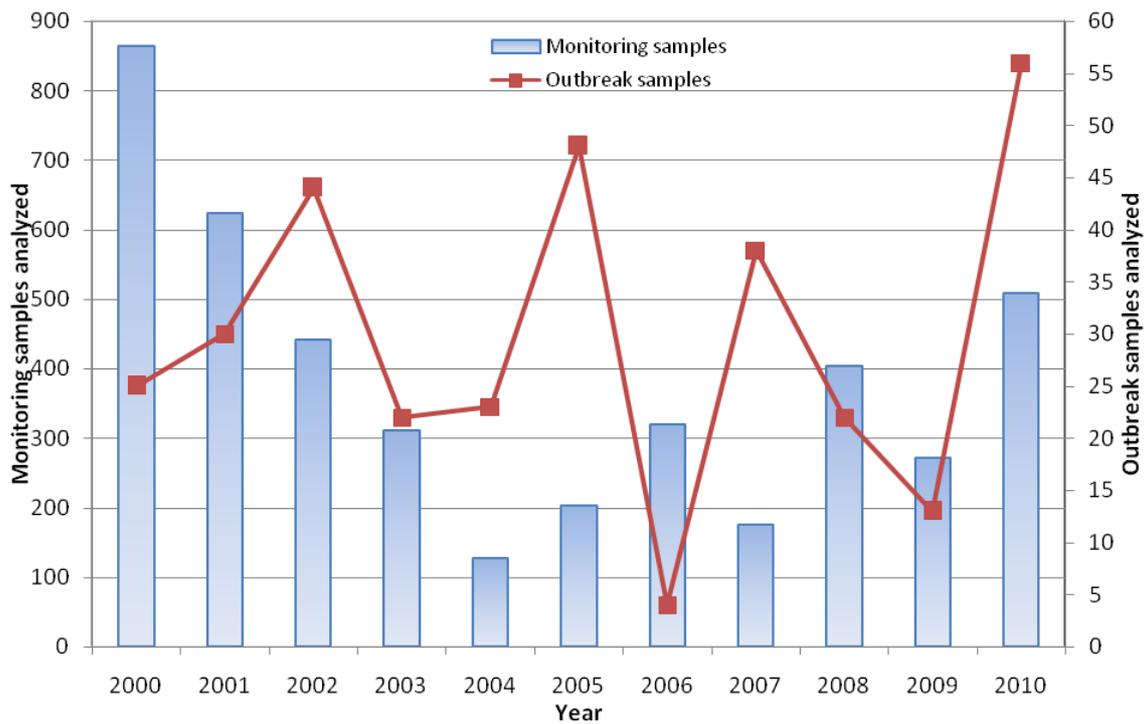
### **2.3. Data analysis**

Statistical analysis was performed with STATA® V.12. Exact binomial tests were used to identify significant differences in rejection rates among food groups and food items. Odd ratios (OR) were estimated using EpiTools epidemiological calculators (Sergeant, 2009).

## **2. Results**

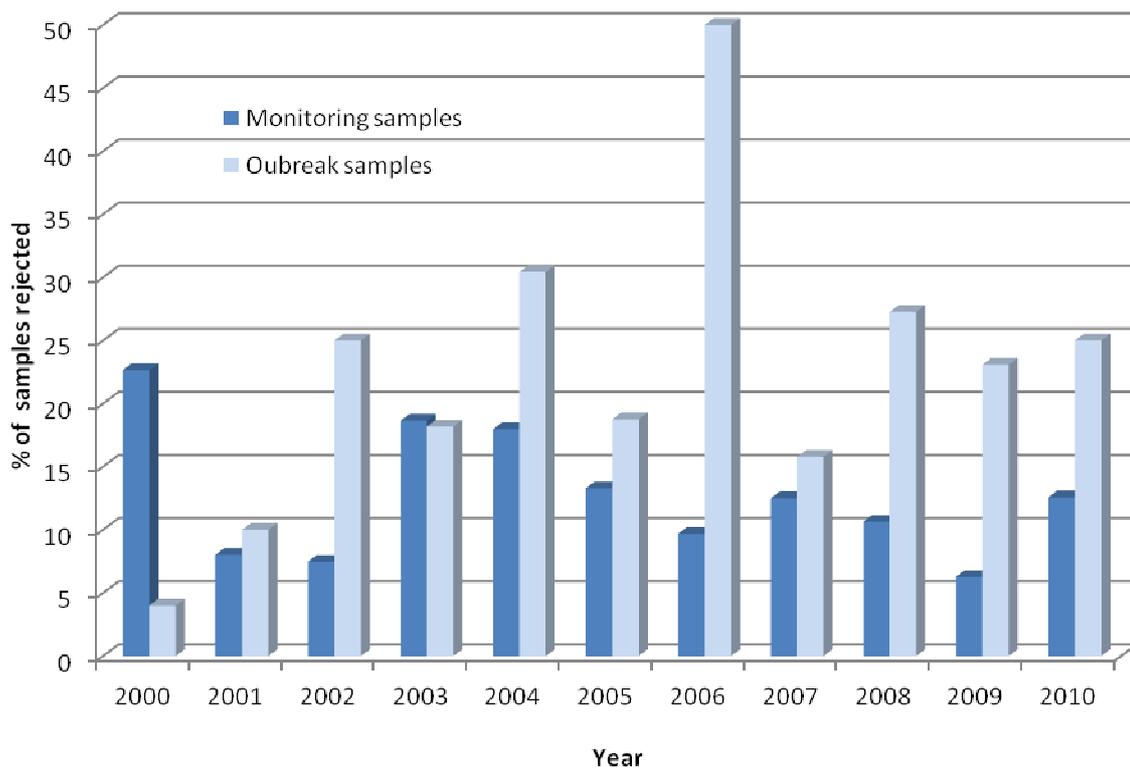
### **2.1. Microbiological analysis**

The results of the 4,576 analysis reports of food samples ready for consumption and water samples analyzed by LACEN-DF between 2000 and 2010 are described and discussed in this study. Over 90% of the samples analyzed were monitoring samples, and 325 were outbreak samples. The number of monitoring samples analyzed decreased along the period under study, with the lowest number in 2004 (Fig.1). The number of outbreak samples analyzed varied, reaching a maximum of 56 samples in 2010.



**Fig. 1.** Number of food ready for consumption and bottled water samples analyzed by the LACEN-DF between 2000 and 2010

A total of 630 samples (13.8%) were rejected for not meeting the parameters established by Brazilian legislation, of which 564 (13.3% [CI 95%: 12.2-14.2]) were monitoring samples, and 66 (20.3% [CI 95%: 15.9-24.7]) were outbreak samples. Overall, the chance of an outbreak sample being rejected was significantly higher than that of a monitoring sample (OR=1.6 [CI 95%: 1.3-2.2]). Fig. 2 shows the rejection rates of monitoring and outbreak samples during the period. The highest rejection rate for monitoring samples was registered in 2000 (22.6%), which was also the year with the highest number of samples analyzed (Fig. 1). For the year of 2006, two of the four outbreak samples analyzed (Fig. 1) were rejected.



**Fig. 2.** Percentage of food ready for consumption and bottled water rejected samples according to the Brazilian legislation analyzed by the LACEN-DF from 2000 to 2010

Monitoring samples from the milk and dairy products group represented 34.6 % of all samples analyzed (Table 2). Over 77% of the 325 outbreak samples analyzed were from the ready-to-eat food group. Ready-to-eat food (18.9%), milk/dairy products (16.1%), water (17.4%), spices/seasonings (13.3%) and ice cream/sorbets (11.0%) had the highest percentage of rejection among the monitoring samples, with the first two groups having the highest rejection rate of all outbreak samples (21.7 and 23.5 %, respectively) (Table 2).

**Table 2.** Samples analyzed by the LACEN-DF between 2000 and 2010, and percentage of rejection according to Brazilian legislation, per food group.

Group	Monitoring samples		Outbreak samples	
	Analyzed, N	Rejected, % (CI 95%)	Analyzed, N	Rejected, % (CI 95%)
Milk and dairy products	1587	16.1 (14.3-18.0)	23	21.7 (7.4-43.7)
Ready-to-eat food	853	18.9 (16.3-21.6)	251	23.5 (18.4-29.2)
Water	385	17.4 (13.7-21.5)	6	0 (0-45.9)
Spices, seasonings, condiments	314	13.3 (9.8-17.6)	0	0
Fruit and vegetables, raw or canned	272	4 (1.9-6.9)	4	25 (0.6-80.5)
Non-alcoholic beverages	232	2.6 (0.9-5.5)	5	20 (0.5-7.1)
Flour, cereals, cakes, industrialized	207	1 (0.1-3.4)	9	0 (0-33.6)
Ice cream and sorbets	181	11 (6.8-16.5)	0	0
Animal products, processed, and eggs	138	0 (0-2.6)	22	0 (0-15.4)
Snacks and appetizers	30	0 (0-11.5)	0	0
Baby food	26	0 (0-13.2)	2	0
Chocolates, candies, sweets	26	0 (0-16.1)	3	0 (0-7)
Total	4251	13.3 (12.2-14.2)	325	20.3 (15.9-24.7)

CI= confidence interval confidence interval at 95%

Within the milk/dairy group, the rejection rate for cheese (439 samples analyzed, including fresh *Minas* cheese, standard *Minas* cheese, mozzarella, cream cheese and cottage cheese) was significantly higher (32.6% [CI 95%: 28.2-37.1]) than for the other foods in the group. Among the milk samples (n=990), pasteurized milk had a significantly higher rejection rate (16.3% [CI 95%: 13.4-19.6]) than UHT (2.2% [CI 95%: 0.8-4.5]) and powdered milk (2.8% [CI 95%: 0.5-7.8]). These frequencies are lower than those found for standard *Minas* cheese (56.9% [CI 95%: 42.2-70.6]) and fresh *Minas* cheese (33.3% [CI 95%: 27- 40.1]).

We did not find any significant difference in the rejection rate among the food items from the ready-to-eat food group. However, we did identify that sandwiches (n=115) had the highest rate of rejected samples (40%). All rejected bottled water samples were of mineral water. In the spices/seasonings group, black pepper (ground and whole peppercorns, n=157) had a significantly higher percentage of rejected samples (21.6% [IC 95%: 15.4-28.9]), with a higher chance of being rejected when compared with the other samples of the group (OR=4.8 [IC 95%: 2.1 – 10.7]). No samples from the animal products, snacks/appetizers, baby food, and chocolate/candies food groups for the period under study were rejected.

Table 3 lists the microorganisms found in the food groups for which at least one sample was rejected for not complying with Brazilian legislation. TTC, *Salmonella* spp and CPS were the parameters most analyzed (74.4, 72 and 38.5% of the total samples collected, respectively). Milk/dairy products, ready-to-eat food, and spices/seasonings groups had the highest % of samples rejected due to TTC (12.0-12.7%). About 9% of the samples analyzed for CPS were rejected (156 samples) for containing counts over the legal limits (500-1000 CFU/g), mainly milk and dairy products (82 samples; 13.8%) (Table 3). About 26-27 % of the *Minas* cheese samples were rejected for having TTC and/or CPS counts higher than the legal limits (500 MPN/g and 500 UFC/g, respectively). Almost 60% of the rejected pasteurized milk samples had TTC counts above the legal limits (2 MPN/mL). Only 0.7% of the samples analyzed for *Salmonella* spp contained this microorganism (all rejected), mainly from the spices/seasonings group (Table 3), mostly black pepper. *B. cereus* was the microorganism most investigated in ready-to-eat food (814 samples), of which 5.8% had microorganism counts above the legal limit (1000 CFU/g) (Table 3), and 40 samples had levels higher than the infectious dose ( $10^5$ CFU/g). Of the 371 samples analyzed for *P. aeruginosa*, 97.6% were bottled water samples, with a 10.5% rejection rate (>2.2 MPN/100 mL; Table 2).

**Table 3.** Microorganisms found in samples analyzed by the LACEN-DF for which there was at least one rejected sample.

Group	Number of samples analyzed (% rejection due to the microorganism)							
	TTC	<i>Salmonella</i>	CPS	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Coliforms	MAC	Coliforms at 30 <sup>0</sup>
All groups <sup>a</sup>	3408 (9.3)	3294 (0.7)	1763 (8.9)	1423 (3.6)	371 (10.5)	885 (10.4)	590 (3)	133 (20.3)
Milk and dairy	1137 (12.7)	1011 (0.5)	592 (13.8)	276 (1.45)	2 (50)	409 (14.4)	508 (2.9)	108 (25)
Ready-to-eat	935 (12.7)	132 (0.7)	772 (8.9)	814 (5.77)	6 (0)	24 (4.2)	8 (0)	19 (0)
Water	360 (1.4)	32 (3.1)	4 (25)	22 (0)	362 (10.5)	363 (5.2)	2 (0)	0 -
Spices/seasonings	257 (12.0)	257 (6.6)	4 (0)	47 (0)	1 (100)	1 (0)	2 (0)	0 -
Fruit & veg., raw, canned	186 (6.4)	185 (0)	66 (0)	50 (0)	0 -	2 (0)	9 (0)	1 (0)
Non-alcoholic beverages	145 (0.7)	132 (0)	17 (0)	55 (1.8)	0 -	27 (0)	17 (0)	0 -
Flour, cereals, cakes	197 (0.5)	179 (0)	103 (0.9)	77 (0)	0 -	9 (11.1)	8 (0)	3 (0)
Ice cream/sorbet	70 (4)	176 (0)	130 (3.8)	16 (0)	0 -	27 (44.4)	28 (10.7)	0 -

<sup>a</sup> includes food groups for which none of the samples was rejected; TTC=thermotolerant coliforms; CPS= Coagulase-positive *Staphylococci*; MAC= mesophilic aerobic count;

*E. coli* was present in 64 of the 866 samples analyzed for this parameter (7.4%). The detection rate for spices/seasonings (22.6% [CI 95%: 13.8 -33.8]) was higher than for milk/dairy products (7.9% [CI 95%: 4.2-13.5%]) and fruit/vegetables (6.8% [CI 95%: 1.9-6.4]), but similar to ready-to-eat food (14.9% [CI 95%: 8.2-16.2]). Among the 12 samples of milk/milk products containing *E. coli*, 9 were of fresh *Minas* cheese. Brazilian legislation only establishes parameters for *E. coli* in bottled water (where it should not be present), but there was no positive sample for this microorganism among the bottled water samples analyzed by the LACEN-DF.

The presence of *S. aureus* was investigated in 276 samples (6% of all samples collected, 96% until 2005), with 31 positive samples, of which 25 of ready-to-eat food (80%), 5 of cheese samples and one of mineral water. In 13 samples, *S. aureus* was found at levels higher than  $10^5$ CFU/g and strains isolated from four outbreak samples (all ready-to-eat food from a single outbreak) tested positive for at least one enterotoxin investigated (SEA, SED, and/or TSSH-1).

## **2.2. Foodborne disease outbreaks reported**

A total of 195 foodborne disease outbreaks occurring in the Federal District were notified by NATHA between 2000 and 2010, of which 162 were investigated. Over 40 % of the investigated outbreaks occurred in 2009 (33) and 2010 (34). During these two years, 69 samples suspected to be involved in outbreaks were analyzed by the LACEN-DF (outbreak samples, Fig. 1).

The food involved was identified in 117 of investigated outbreaks (72.2 %), with 126 samples collected (Table 4). Ready-to-eat food (including sandwiches, mayonnaise and meat food) were the incriminated foods in over half of the outbreaks. The etiological agent was identified in 80 outbreaks, 41.2% of which involved *B. cereus*, 26.2% *S. aureus*, and 22.5% *Salmonella* spp. A total of 104 food samples were collected from these 80 outbreaks (Table 4).

**Table 4.** Food and etiologic agents identified in the foodborne disease outbreaks occurring in the Federal District from 2000 to 2010 and investigated by NATHA

Food	NF <sub>1</sub>	% <sup>a</sup>	Agent	NF <sub>2</sub>	% <sup>b</sup>
Outbreaks with food identified = 117			Outbreaks with agent identified = 80		
Ready-to-eat food	60	51.3	B. cereus	33	41.2
Bakery products	14	12.0	S. aureus	21	26.2
Water	11	9.4	Salmonella spp	18	22.5
Cheese	7	6.0	C. perfringens	15	18.8
Croquets/savory	7	6.0	E. coli	5	6.2
Fruits/nuts	7	6.0	V. parahaemolyticus	3	3.8
Eggs/egg products	7	6.0	Others	9	11.2
Others	12	11.1	Total of samples	104	
Total of samples	126				

NF<sub>1</sub>= number of food samples collected during the outbreaks with the food identified; <sup>a</sup> relative to 117 outbreaks with the food identified; NF<sub>2</sub>= number of food samples collected during the outbreaks with the agent identified; <sup>b</sup> relative to 80 outbreaks with the agent identified

The investigated outbreaks involved 3904 cases, with an average of 24.1 sick individuals *per* outbreak; 699 individuals received medical care. The highest number of individuals *per* outbreak occurred in 2003 (305 individuals in 4 outbreak). However, neither the food involved nor the etiological agent was identified in any of these outbreaks. Most of the individuals involved were between 20 and 49 years of age, but in 2007 they were mostly between the ages of 5 and 9 (31 individuals). The only death registered during the period occurred in 2010 due to an outbreak at a foster home that affected 32 children, 11 of whom were under the age of 4. Rotavirus was the agent involved, but the incriminated food was not identified.

The criterion used to conclude the investigation was included in 101 investigated outbreak reports, (62.3%). The criterion was clinical-epidemiological in 67.3% of them, laboratory-confirmed in 17.8%, and based on food analysis alone or including laboratory confirmation in 14.8%.

### 3. Discussion

The results of this investigation have shown that milk and dairy products was the food group most analyzed by the LACEN-DF, and was also the group with the

highest rejection rate. Cheese had the highest frequency of rejection within this group, mainly *Minas* cheese. Typically Brazilian, *Minas* cheese is the most consumed cheese in the country (about 30g/person/day; IBGE, 2011). The fresh type, which can be made with raw milk in artisanal production (Regulation 44864/2008; state of Minas Gerais), has high humidity (maximum of 45.9%), and a maximum shelf life of 9 days under refrigeration. Standard/ripened *Minas* cheese undergoes maturation for 20-30 days before marketing, with a shelf life of about 90 days under refrigeration (Perry et al., 2004).

About 13% of the milk and dairy product samples analyzed by the LACEN-DF were rejected due to high TTC counts, mainly *Minas* cheese samples. Salotti et al., (2006) found 75% of the 60 fresh artisanal and industrial *Minas* cheese samples analyzed in São Paulo to be non-compliant with the legal limits for TTC. TTC is an indicator of the possible presence of pathogens such as *E. coli*, which was detected in 7.9% of the milk/dairy samples analyzed by the LACEN-DF for this parameter, mostly fresh *Minas* cheese. The presence of *E. coli* has been widely accepted as an indicator of faecal contamination during food handling (Campos et al., 2006). *E. coli* was present in all 55 samples of *Minas* cheese produced with raw milk in Minas Gerais, and in 70% of the 24 samples of fresh *Minas* cheese in the state of Goiás (Campos et al., 2006). Rosengren et al., (2010) found *E. coli* in 34% of the 55 raw milk cheeses analyzed in Sweden; levels in raw milk fresh cheese were significantly lower when starter cultures were used, indicating that contamination occurred later in the cheese production process.

About 26% of the *Minas* cheese samples analyzed by the LACEN-DF were rejected for containing CPS counts higher than the legal limits, a lower rate than that found by Moraes et al., (2009; 30.9%) and Brant et al., (2007; 92.5%) in samples collected in Minas Gerais. Salotti et al., (2006) found 15 % of the 60 samples of fresh *Minas* cheese containing high CPS counts, with higher rejection rates among artisanal cheese. Among the *Staphylococcus* species capable of producing coagulase, *S. aureus* is the most prevalent in staphylococcal food intoxication outbreaks worldwide, causing nausea, stomach cramps, vomiting, and diarrhea (Hennekinne et al., 2012; FDA, 2012). Cow mastitis, mainly caused by *S. aureus*, is considered one of the main problems in dairy cattle infections, and may affect the

sanitary conditions of the produced milk (Zafalon et al., 2009). *S. aureus* was only found in cheese samples among the 25 milk/dairy samples analyzed for this parameter by the LACEN-DF.

*Salmonella* spp and *E. coli* were mostly found in samples from the spices/seasonings group, mainly black pepper. Moreira et al., (2009) found 5.6% of the 233 spice samples collected in the state of São Paulo containing *Salmonella*, similar to what was found in the Federal District. The authors also found black pepper (and cumin), to have the lowest microbiological quality among the spices. In Brazil, contamination of black pepper with *Salmonella* spp and other enterobacteria occurs mainly due to the lack of good manufacturing practices, mostly during the drying process, and may occur on the floor in an open area to which domestic animals have free access (Duarte et al., 2005). A *Salmonella* outbreak associated with salami products made with imported contaminated black and red pepper was recently reported in the USA (Gieraltowski et al., 2012).

About 20% of the ready-to-eat food samples analyzed by the LACEN-DF were rejected, a rate similar to what was found by Cardoso et al., (2010) in ready-to-eat food samples collected at 83 public schools in the state of Bahia (20.4%). The authors also found 2.4% of the samples containing *E. coli*, a much lower frequency than that found in the Federal District (14.9% of the ready-to-eat food samples analyzed for this parameter). High contamination of ready-to-eat food is a worldwide issue and is most likely caused by inadequate cleaning practices or hygienic handling (Christison et al., 2008; Sospedra et al., 2013).

Data obtained from NATHA showed that ready-to-eat food was the food group most involved in the outbreaks investigated in the Federal District, confirming other studies that show that foods that are handled during preparation and are not heated prior to consumption present the greatest risk (Tebbutt, 2007). The etiological agents identified in the outbreaks investigated by the NATHA included *B. cereus*, *S. aureus*, and *Salmonella* spp., which were also the most prevalent agents found in the outbreak samples analyzed by the LACEN-DF (data not shown).

The clinical-epidemiological criterion was used to conclude almost 70% of the outbreaks investigated by NATHA, a result that was expected as most of the notifications came from the hospitals where the patients were under care. In Brazil,

when the food involved in an outbreak is identified by the affected individuals, the food is normally discarded to avoid additional exposure. Hence, very rarely is the food available for analysis. Indeed, food analysis information was used to conclude only 14.8% of the investigations, similar to what was found for the 3,737 outbreaks reported nationwide from 1999 to 2004 (15.5%; do Carmo et al., 2005).

In a review to investigate the contribution of microbiological analysis to food safety in England and Wales, Tebbutt (2007) pointed out that, although food microbiological analysis was important during outbreak investigation, routine testing by local authorities is often of limited use and could be improved by more targeted surveillance. In the Federal District, ready-to-eat food, the food group most involved in the outbreaks investigated by NATHA, was the second most analyzed food group under the LACEN-DF surveillance program. However, we found that the results of the outbreak sample analysis conducted by the LACEN-DF were of limited use for the investigation of the outbreaks. Although 126 food items were identified as being involved in the outbreaks investigated by NATHA, only in 15 of the outbreaks did the food analyzed contribute to the conclusion of the investigation. On the other hand, 44 outbreak samples analyzed by the LACEN-DF had either *B. cereus* or *S. aureus* above the infectious dose or tested positive for *E. coli* or *Salmonella* spp. However, these results were not reflected in the outbreak investigations conducted by NATHA.

The increase in the number of foodborne disease outbreaks reported and investigated in the Federal District in 2009 and 2010 indicates a significant improvement in local epidemiological surveillance efforts. However, about one-third of the investigated outbreaks did not have the food involved identified, over half did not have the agent identified, and almost 40% did not have the conclusion criterion reported. Lack of the etiologic agent is mainly due to late notification and sampling, the use of antibiotics by the affected population, and the limited number of routine analyses conducted by the laboratories, including the identification of the enterotoxigenic strains (do Carmo et al., 2005). Only four outbreak samples analyzed by the LACEN-DF during the period under study were tested for staphylococcal enterotoxins.

At the national level, over 8,500 outbreaks were reported by the local sanitary authorities to the national epidemiological surveillance system from 2000 to 2011,

with 88 deaths (MS, 2012b). The main vehicles involved were mixed foods (~ 1,500 outbreaks) and eggs and egg products (~900 outbreaks); milk and dairy products were involved in over 300 outbreaks. *Salmonella* spp was the main etiologic agent identified (~1,700 outbreaks), followed by *S. aureus* (~800 outbreaks; MS, 2012b). This profile is different from what was found in the Federal District, where *B. cereus* was the main agent identified in the investigated outbreaks.

The number of food disease outbreaks reported in Brazil is most likely underestimated. According to do Carmo et al., (2005), over 3 million hospitalizations due to foodborne diseases (ICD 10 A00 to A09) occurred in the country from 1999 to 2004, and 25 281 fatalities from 1999 to 2002. Most of the outbreaks involved in these cases were probably never investigated or reported. Additionally, the reporting of foodborne disease outbreaks only became compulsory in the country in 2011, being restricted to outbreaks occurring on ships or aircraft (Regulation 104/2011, Brazilian Ministry of Health).

The results of this study indicate that the LACEN-DF should prioritize the analysis of ready-to-eat food under its microbiological surveillance programs, due to their frequent involvement in foodborne disease outbreaks. Efforts should be made to improve the outbreak notification and investigation system and the laboratory capabilities in the Federal District so that biological and food samples may be collected in a timely and correct manner so as to identify the etiological agent. Additionally, it is essential that CPS positive samples be tested for *S. aureus* and the toxigenic potential of the isolated strains determined so that the vehicle involved in the outbreaks are identified. This is the first study reporting governmental microbiological data on food and water in Brazil that relates food analyses to outbreak reporting. Comparison with other scenarios in the country is therefore not possible.

This study highlighted the inadequate hygienic-sanitary conditions of the *Minas* cheese available for consumption in the Federal District and other Brazilian regions, and the importance of implementing control measures and good manufacturing practices during the handling and storage of this product.

## Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the Public Health Laboratory (LACEN-DF) for providing the food analysis reports and the Office of Water and Foodborne Diseases (NATHA) for providing outbreak information. We thank Ravane Gracy Ament Marcheti for helping with the data collection and Prof. Marcia Aguiar Ferreira for providing many thoughtful suggestions.

## References

- APHA (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, DC: American Public Health Association (APHA), USA.
- Brant, L.M.F., Fonseca, L.M., Silva, M.C.C. (2007). Microbiological quality of artisanal Minas cheese, manufactured in the region of Serro-MG. *Arq Bras Med Vet Zoot*, 59, 1570-1574.
- Campos, M.R.H., Kipnis, A., Porfírio, M.C.D., Borges, A. (2006). Phenotypic characterization by antibiogram of *Escherichia coli* strains isolated from handlers, raw milk and “minas frescal” cheese samples in a dairy process plant in Goiás, Brazil. *Ciênc Rural*, 36, 1221-1227.
- Cardoso, R.C.V., Almeida, R.C.C., Guimarães, A.G., Goes, J.A.W.G., Santana, A. A. C., Silva, S.A., Junior, P.O.V., Brito, L. (2010). Microbial quality assessment of ready-to-eat foods served at schools supported by the National Scholar Food Supply Program. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 69, 208-13.
- Christison, C. A., Lindsay, D., Von Holy, A. (2008). Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa. *Food Control*, 19, 727-733.
- Do Carmo, G.M.I.C., Oliveira, A.G., Domech, C.P., Santos, D.A., Almeida, M.G., Berto, L.H., Alves, R.M.S., Carmo, E.H. (2005). Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 - 2004. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. *Boletim Epidemiológico*, 6, 1-7.
- Duarte, M.L.R., Albuquerque, F.C. (2005). Sistema de Produção da Pimenteira-do-reino Embrapa Amazônia Oriental. *Sistemas de Produção*, 1. Available at

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/colheita.htm>.

FDA (Food and Drug Administration) (2012). Bad bug book. Handbook of Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. Food and Drug Administration, 2<sup>nd</sup> ed. Available at <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/UCM297627.pdf>.

Gieraltowski, L., Julian, E., Pringle, J., Macdonald, K., Quilliam, D., Marsden-Haug, N., Saathoff-Huber, L., von Stein, D., Kissler, B., Parish, M., Elder, D., Howard-King, V., Besser, J., Sodha, S., Loharikar, A., Dalton, S., Williams, I., Barton, B.C. (2012). Nationwide outbreak of Salmonella Montevideo infections associated with contaminated imported black and red pepper: warehouse membership cards provide critical clues to identify the source. *Epidemiol Infect*, 30, 1-9.

Hennekinne, J-A., De Buyser, M-L., Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev*, 36, 815-636.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2011). Pesquisa de Orçamentos Familiares. Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. Available at: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pof/2008\\_2009\\_analise\\_consumo/default.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/default.shtm).

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). (2003). Instrução Normativa nº62 de 26/08/2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Available at: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>.

Moraes, P.M., Vicoso, G.N., Yamazi, A.K., Ortolani, M.B.T., Nero, L.A. (2009). Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. *Foodborne Pathog Dis*, 6, 245-249.

Moreira, P.L., Lourenção, T. B., Pinto, J.P., Rall, V.L. (2009). Microbiological quality of spices marketed in the city of Botucatu, São Paulo, Brazil. *J Food Prot*, 72, 421-4.

- MS (Ministério da Saúde). (2012a). Doença Diarréica aguda. Situação Epidemiológica. Ministério da Saúde. Brasil. Available at: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1549](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1549).
- MS (Ministério da Saúde). (2012b). Dados Epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos do Ministério da Saúde. Available at: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_epidemiologicos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos.pdf).
- Oliveira, A.B.A., De Paula, C.M.D., Capalunga, R. (2010). Foodborne diseases, main etiologic agents and general aspects: a review. *Revista HCPA*, 30, 279-285.
- Perry, K.S.P. (2004). Cheese: chemical, biochemical and microbiological aspects. *J Braz Chem Soc*, 27, 293-300.
- Rosengren, A., Fabricius, A., Guss, B., Sylven, S., Lindqvist, R. (2010). Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *Int J Food Microb*, 144, 263–269.
- Salotti, B.M., Carvalho, A.C.F.B., Amaral, L. A., Vidal-Martins, A.M.C., Cortez, A.L. (2006). Microbial quality of marketable "minas frescal" cheese in Jaboticabal, SP, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zoot*, 73, 171-175.
- Sergeant, E.S.G. (2009). Epitools epidemiological calculators. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease. Available at <http://epitools.ausvet.com.au>, accessed February 10, 2012. (Online).
- Sospedra, I., Rubert, J., Soriano, J. M., Mañes, J. (2013). Survey of microbial quality of plant-based foods served in restaurants. *Food Control*, 30, 418-422.
- Tebbutt, G.M. (2007). Does microbiological testing of foods and the food environment have a role in the control of foodborne disease in England and Wales? *J Appl Microb*, 102, 883-891.
- WHO (World Health Organization). 2008. Foodborne disease outbreaks. Guidelines for investigation and control. World Health Organization, p.1-162.
- Zafalon, L.F., Arcaro, J.R.P., Filho, A.N., Ferreira, L.M., Veschi, J.L.A. (2009). Toxin gene-carrier *Staphylococcus aureus* isolated from diverse transmission sources during the milking. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 68, 269-277.

### **CAPÍTULO III – AVALIAÇÃO DE RISCO DA EXPOSIÇÃO A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PELO CONSUMO DE QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL**

Os resultados obtidos na primeira etapa do presente estudo, além dos dados da literatura subsidiam as seguintes conclusões:

- O grupo de leite e derivados foi o mais reprovado dentre os alimentos monitorados pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF), particularmente, o queijo tipo Minas frescal;
- O queijo tipo Minas frescal é um alimento de alto consumo no Brasil, que não sofre maturação, sendo bastante manipulado;
- *Staphylococcus* coagulase positiva é o patógeno mais prevalente investigado nas investigações em alimentos;
- Segundo dados do Núcleo de Agravos e Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar do Distrito Federal (NATHA-DF), *S. aureus* é o segundo maior causador de surtos (critério clínico-epidemiológico) na região, similarmente ao reportado pelo Ministério da Saúde (MS) no período de 2000 a 2010;
- Apesar de pratos mixtos, prontos para o consumo foi o alimento mais envolvido nos surtos investigados, estes alimentos têm composição variada, o que dificulta a identificação de um alimento único
- *S. aureus* é comumente encontrado no ambiente e em manipuladores de alimentos, inclusive no queijo.
- Na maioria dos estudos de investigação de surto conduzidos no Brasil, foi isolada linhagem de *S. aureus* capaz de produzir enterotoxina SEA, ou esta toxina foi detectada nos alimentos.

Diante do exposto, identificou-se a combinação queijo tipo Minas frescal e *S. aureus* (ingestão de SEA) como um problema de segurança alimentar que necessita de um estudo de avaliação do risco. Os resultados desta avaliação serão apresentados sob o formato de um artigo científico, que será posteriormente preparado para ser submetido à publicação em revista de relevância internacional.

### 3.1 INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é o micro-organismo de maior interesse para a segurança alimentar de produtos lácteos, pois tem alta prevalência como causa da mastite subclínica em vacas leiteiras e está presente naturalmente na pele e mucosas de humanos, permitindo assim, sua veiculação no leite e derivados, que podem vir a ser contaminados durante o processamento (Sandel, Mckillip, 2004; Srinivasan et al. 2006; Ferguson et al. 2007). *S. aureus* são cocos Gram-positivos, catalase e coagulase positivas, não móveis, anaeróbios facultativos. É capaz de sobreviver em variadas faixas de temperatura (10-45°C), pH (4-9) e atividade de água ( $a_w$ ; 0,83 a 0,99) (Larkin et al., 2009; Podkowik, et al., 2013). Contagens de *S. aureus* a partir de  $10^5$  unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) podem produzir quantidades suficientes de enterotoxinas para causar intoxicação humana (BAD BUG BOOK, 2013).

O queijo tipo Minas frescal é bastante apreciado no Brasil, representando cerca de 40% da produção de queijos brasileiros (Lima et al., 2008). Seu consumo está associado a surtos estafilocócicos (Carmo et al., 2002) pois apresenta condições ótimas de crescimento bacteriano, como pH entre 5 e 6 (Rocha et al., 2006). O queijo tipo Minas frescal deve ser consumido em até 15 dias após sua fabricação, pois é altamente perecível, mesmo sob refrigeração (Sangaletti et al., 2009). Mais de 70% de isolados de *S. aureus* de queijo tipo Minas frescal são enterotoxigênicos (Argudim et al., 2010). Vários estudos indicam alta prevalência de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) em queijos tipo Minas frescal no Brasil. Cerca de 30% das amostras analisadas no Distrito Federal (Nunes, et al., 2013) e Minas Gerais (Moraes et al., 2009) apresentaram contagem acima do máximo permitido pela legislação brasileira.

As toxinas estafilocócicas (*Staphylococcal enterotoxin*, SE) incluem as SEs (A, B, C; C<sub>1,2,3</sub>; D, E, G,H,I, R,S e T) e a toxina da síndrome do choque tóxico TSSH-1 susceptível à clivagem da pepsina, mas capaz de atravessar a membrana mucosa (Dinges et al., 2000; Argudim et al., 2010; Maina et al., 2012). Essas toxinas se ligam diretamente a molécula de histocompatibilidade, estimulando a clonagem de células T e a produção de citocinas, causando sintomas de febre, vasodilatação, aumento

da expressão e adesão plaquetária, apoptose, e a síndrome do choque tóxico (Dinges et al., 2000).

Essas toxinas são resistentes ao calor (121°/10 minutos), radiação gama e baixo pH, o mesmo ambiente que inibe a bactéria que as produziu, assim como é resistente a enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal, o que favorece sua ação deletéria (Genigeorgis, 1989; Tsutsuura, Murata, 2013).

A intoxicação estafilocócica é uma doença de origem alimentar com período de incubação entre 30 minutos e 8 horas após a ingestão, caracterizada por um ou mais dos sintomas de náusea, vômitos, diarreia e dor abdominal, os quais, em geral, cessam dentro de 24-48 horas (Asao, 2003; Kérouanton et al., 2007; Schelin, 2011).

No Brasil, 8.663 surtos de intoxicação alimentar foram reportados pelo Ministério da Saúde entre 2000 e 2011, sendo que a maior parte deles aconteceu nas residências. *S. aureus* foi o segundo maior causador destas intoxicações, envolvido em 799 surtos no período (Brasil, 2013). Do total de surtos, 350 foram causados pelo consumo de leite e derivados contaminados. Nos Estados Unidos, estima-se que ocorreram 241.188 casos de intoxicação estafilocócica entre 2000 e 2008, com 1.064 hospitalizações e seis mortes/ano (Scallan et al., 2011).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o risco da ingestão de enterotoxina A pelo consumo de queijo tipo Minas frescal no Brasil.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 Fonte de dados

#### 3.2.1.1 Consumo de queijo tipo Minas frescal no Brasil

Dados de consumo de queijo tipo Minas frescal pela população brasileira foram obtidos do arquivo da Pesquisa de Orçamento Familiar 2008/2009 (POF 7), conduzida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Nessa pesquisa, 34.003 indivíduos entre 10 e 104 anos, registraram o consumo de alimentos em dois dias não consecutivos. A POF também inclui dados de idade de

cada participante e fatores de expansão para extrapolar cada participante para um grupo populacional. A população expandida foi estimada utilizando o programa SPSS V. 20.

#### 3.2.1.2 Frequencia e nível de contaminação de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo tipo Minas frescal

Os resultados de análise de queijo tipo Minas frescal foram obtidos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os quais foram fornecidos pelos laboratórios centrais (LACENs) dos estados do Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio de Janeiro, Roraima e Santa Catarina, referentes às análises realizadas entre 2010 e 2012. Adicionalmente, os dados do Distrito Federal (2000-2010) obtidos diretamente do LACEN-DF foram utilizados. Para este estudo, a contagem de SCP determinada no laboratório foi considerada a concentração inicial no momento da aquisição do produto no comércio.

Dados de 400 amostras de queijo tipo Minas frescal analisadas pelos LACENs foram avaliadas neste estudo. Os dados obtidos incluíram informações sobre estado de coleta, data de fabricação, data de vencimento, data ou ano da coleta, temperatura do local de coleta, peso do produto, umidade (% p/p), gordura total (% p/p), gordura extrato seco (% p/p), sódio (mg/30g e mg/50g), *Salmonella* spp. (presença/ausência), *Listeria monocytogenes* (presença/ausência), enumeração de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* (NMP/g) e SCP (UFC/g). Os dados individuais das amostras para os principais parâmetros estão contidos no Anexo II.

#### 3.2.1.3 Temperatura de armazenamento e pH

Dados de temperatura de um refrigerador no domicílio (temperatura de armazenamento) foram utilizados os registros diários de temperatura de um refrigerador comum do Laboratório de Toxicologia da UnB, obtidos entre 4/12/2009 a

27/05/2011. Assumiu-se que o consumidor pode armazenar o queijo tipo Minas frescal sob refrigeração por até 7 dias antes do consumo (168 horas).

Os valores de pH de queijo tipo Minas frescal foram gentilmente cedidos pela Prof. Susana Saad, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), e determinados em 76 amostras obtidas no comércio da cidade de São Paulo.

### **3.2.2 Modelo de predição de risco de contaminação por rede neural artificial**

Esta etapa do estudo objetivou propor um modelo de predição de risco da presença de SCP em queijo tipo Minas frescal segundo categorias de níveis de contaminação. Dentre 25 variáveis no banco de dados de análise de queijo tipo Minas frescal analisadas pelos LACENs, foram selecionadas aquelas que gerassem o maior número de amostras sem nenhum dado faltante. As variáveis consideradas para este modelo foram: tempo de validade (dias entre a coleta e data de vencimento); tempo da fabricação (dias entre a fabricação e a coleta); temperatura de coleta; peso; coliformes termotolerantes, umidade e enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva. Os dados dos LACENs foram exportados para o software Neural Tools versão 6.1 do @risk da Palisade® para a construção do modelo.

Dados de algumas variáveis consideradas para este estudo não foram reportados por alguns LACENs. No caso onde o local de coleta era refrigerador, câmara fria ou balcão refrigerado, mas não havia informação da temperatura, a moda dos valores reportados para outras amostras foi inserida no campo faltante. No Distrito Federal, a temperatura de coleta foi informada como “ambiente” para algumas amostras. Nesse caso, foi usada a moda da temperatura ambiente registrada pelo Instituto Nacional de Metrologia (INMET) no período entre 2001-2012 (informação gentilmente cedida por Rafaela Maciel Rebelo)

A enumeração de SCP (variável de previsão ou dependente) foi transformada em 3 categorias. A categoria 1, com valores de enumeração  $\leq 1000$  UFC/g (limite previsto na legislação Brasileira; RDC12/2001); a categoria 3 com valores maiores ou iguais a dose necessária para a bactéria produzir enterotoxinas,  $\geq 10^5$  UFC/g

(Bad Bug Book, 2013); e a categoria 2, com enumerações entre  $>1000$  UFC/g e  $<10^5$  UFC/g. Foram incluídas também na categoria 2 amostras reportadas somente como  $>100$  UFC/g, sem especificar a enumeração.

A etapa de treinamento da rede neural probabilística (RNP) foi feita com as amostras que possuíam todos os dados reportados para as 7 variáveis consideradas. A etapa teste foi realizada com os casos incompletos, para os quais os dados ausentes foram preenchidos pela média dos centróides dos grupos de cada variável (Neilson, 2011). Este procedimento tem como benefício a minimização da variância dentro de cada grupo e maximização da variância entre os grupos, e foi realizado utilizando o macro *K-means clusters analysis* (Neilson, 2011).

A terceira etapa do modelo de rede neural é a fase de predição, onde usamos dados de novas amostras não consideradas nas etapas anteriores. Neste estudo foram 6 (seis) novas e únicas amostras de queijo tipo Minas frescal, analisadas no segundo semestre de 2012 pelo LACEN-DF. A variável umidade para estas amostras foi preenchida com a moda das umidades medidas nas amostras utilizadas no estudo.

### 3.2.3 ComBase

O programa ComBase foi utilizado para estimar a taxa de crescimento ( $\mu$ ) de *S. aureus* em queijo tipo Minas frescal por meio da ferramenta *ComBase Predictor*. Os parâmetros necessários para esta estimativa são: concentração inicial, estado fisiológico do inóculo (EF), temperatura de armazenamento, pH e %NaCl. A concentração inicial de *S. aureus* foi assumida como 1000 UFC/g (3 log), o limite legal de SCP para queijo tipo Minas frescal utilizado pelos LACENs. EF apresenta valores entre 0 (sem crescimento, fase lag infinita) e 1 (crescimento inicia-se imediatamente, sem fase lag). Quando não se assume qualquer valor de EF, o programa automaticamente reporta um valor *default*, que para *S. aureus* é 0,045049. Além deste valor, testamos também o valor de  $\mu$  para EF de 0,1 e 0,5. O programa também reporta o *doubling time*, equivalente ao tempo requerido para dobrar a população do micro-organismo na fase exponencial, expresso pela Equação 3.1. A fase lag ( $\lambda$ ) é estimada a partir da Equação 3.2:

$$\text{Doubling time} = \ln(2) / \mu \quad (\text{Eq. 3.1})$$

$$\text{lag } (\lambda) = -\ln(EF) / \mu, \quad (\text{Eq. 3.2})$$

### **3.2.4 Pathogen Modelin Program**

As taxas de crescimento também foram estimadas utilizando o programa PMP. Adicionalmente, este modelo foi utilizado para estimar a densidade máxima da população (DMP), que deve ser utilizada como valor fixo do limite máximo de nível de contaminação alcançada pela simulação de Monte Carlo. A temperatura mínima prevista no PMP para predição de *S. aureus*, é de 10°C e máxima de 42°C. O modelo estima também a fase lag ( $\lambda$ ) e o tempo de geração.

### **3.2.5 Avaliação da exposição à enterotoxina estafilocócica (SEA) pelo consumo de queijo tipo Minas frescal**

Aos níveis de contaminação inicial (obtidos pelos LACENs) foram adicionados uma taxa de crescimento específica  $\mu$  (log/hora), preditas nos software ComBase e pelo PMP. As estimativas foram feitas considerando que o indivíduo consome o queijo em até 7 dias após sua aquisição (168 horas) (Rho, Schaffner; 2007). Assumiu-se que o nível de contaminação não sofre alteração significativa no percurso da compra até a residência (Ávila et al., 2010). Neste estudo assumiu-se que resultados de SCP encontrados nas amostras analisadas refletem os níveis de *S. aureus*, e serão expressos como tal na avaliação de risco. As estimativas da exposição foram feitas usando simulação de Monte Carlo no programa @risk (Palisade®), com 1.110.000 iterações, tolerância de convergência de 5% e nível de confiança: 90%

#### **3.2.5.1 Descrição das variáveis do modelo**

A Tabela 1 mostra as variáveis de *input* utilizados para a simulação de Monte Carlo na ferramenta @risk. A variável *prevalência inicial* ( $P_{iq}$ ) de contaminação de *S. aureus* no queijo tipo Minas frescal foi obtida dividindo-se o número de amostras positivas pelo número de amostras analisadas analisadas pelos LACENs para o parâmetro SCP expressa numa distribuição discreta. Esta é uma distribuição que especifica os resultados positivo e negativo e suas probabilidades.

A variável *contaminação* ( $C_{qi}$ ) foi também obtida dos dados dos LACENs. Naquelas amostras em que o resultado foi reportado como <100 UFC/g assumiu-se o valor 10 UFC/g para que a transformação logarítmica desse valor resultasse em 1 logUFC/g.

A variável *nível de contaminação inicial* ( $N_{ci}$ ) é imputado quando a prevalência é positiva, dependendo então da  $P_{iq}$  considerada a cada iteração. A esta variável é adicionada as fórmulas da taxa de crescimento estimadas pelo ComBase e PMP.

As variáveis *temperatura de armazenamento* ( $T$ ), *tempo* ( $t$ ) e *pH* foram obtidas como descrito anteriormente

As variáveis  $EC1$  e  $EC2$  são as equações de crescimento obtidas pela correlação linear entre temperatura  $T$  e a raiz quadrada taxa crescimento  $\mu$  estimadas pelo ComBase e pelo PMP, respectivamente.

As variáveis  $Elag1$   $Elag2$  são as equações da duração da fase lag obtida pela correlação linear entre temperatura e da raiz quadrada do inverso fase lag estimada pelo ComBase, e PMP, respectivamente.

A variável *densidade máxima da população bacteriana* ( $DMP$ ) foi obtida do PMP de três combinações de %NaCl e temperatura máxima de armazenamento.

A variável *contaminação no momento do consumo* ( $C_{qcon}$ ) foi obtida da condição de que a prevalência inicial ( $P_{iq}$ ) fosse diferente de zero e o tempo decorrido fosse maior que a fase lag.

A variável *nível de contaminação no momento do consumo*  $N_{qcon}$  é obtida da  $C_{qcon}$  solicitada a cada iteração e da condição de que ela seja inferior ao DMP.

A variável *porção de queijo* ( $P$ , gramas) foi obtida do estudo da POF 2008/2009 para idosos, adultos e adolescentes.

A variável *prevalência de cepas toxigênicas* ( $P_{gt}$ ) é de 73%. Este percentual diz respeito às cepas com genes toxigênicos tipo a, b, c, d, e, g, h, i, j, l e tst-1), em queijos tipo Minas frescal, obtido por Arcuri et al. (2010).

A variável *concentração de enterotoxina A (SEA) (Tox)*, em log ng/g, é dada pela equação  $Tox = 0,9300751 * N_{qcon} - 6,662092$ , obtida por Kim et al. (2009) a partir de dados de crescimento de Soejima et al. (2007). Esta equação é aplicada quando o nível de contaminação é  $\geq 5\log$ .

O *output* do modelo (*dose D*) é dado pela equação 3.3 para as populações de idosos, adultos e adolescentes. Esta dose foi obtida por simulação de Monte Carlo, configuração de semente fixa e gerador Mersenne Twister, com 1.110.000 iterações ditadas pela precisão de 5% e intervalo de confiança (IC90) 90% para o ponto de convergência.

$$\text{Dose, ng} = 10 \quad \text{Dose, ng} = 10^{\text{Tox} (\log \text{ng/g}) * P} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

Dois doses foram estimadas neste estudo, a D1 utilizando as equações geradas pelo ComBase (*EC1* e *Elag1*, modelo 1), e a D2, utilizando as equações gerada pelo PMP (*EC2* e *Elag2*, modelo 2). As duas doses foram estimadas para adolescentes, adultos e idosos.

**Tabela 3.1** Variáveis do modelo de exposição à enterotoxina A estafilocócica pelo consumo de queijo tipo Minas frescal.

<i>Input/output</i>	Variável	Fórmula	Descrição	Unidade
<i>Input</i>	P <sub>iq</sub>	=RiskDiscrete(0:1;0,80769;0,19231)	Prevalência inicial de <i>S. aureus</i> no queijo	%
<i>Input</i>	C <sub>qi</sub>	=RiskHistogram(Concentração de <i>S. aureus</i> )	Concentração inicial de <i>S. aureus</i> no queijo	logUFC/g
-	N <sub>ci</sub>	=SE(P <sub>iq</sub> =0;0;C <sub>qi</sub> )	Nível de contaminação inicial de <i>S. aureus</i>	UFC/g
<i>Input</i>	T	=RiskHistogram(temperaturas originais)	Temperaturas (°C) usadas no Combase	°C
<i>Input</i>	t	=RiskUniform(1;168)	Tempo (horas)	horas (h)
-	EC1	=(0,02531*T - 0,0753)^2	Fórmula de crescimento (ComBase) - modelo I	logUFC/g/h
	EC2	=(0,0193*T - 0,0739)^2	Equação de crescimento (PMP) - modelo II	
-	Elag1	=1/(0,0277*T-0,0905)^2	Equação de duração de fase lag (ComBase)	Horas (h)
	Elag2	=1/(0,0208*T-0,1291)^2	Equação de duração de fase lag (PMP)	
-	DMP	9,6 logUFC/g	Densidade máxima da população de <i>S. aureus</i> PMP	logUFC/g
-	C <sub>qcon</sub>	=SE(P <sub>iq</sub> =0;0;SE(t<lag;(N <sub>ci</sub> ); C <sub>qi</sub> +(EC <sub>1,2</sub> (t-Elag <sub>1,2</sub> ))))	Concentração de <i>S. aureus</i> no momento do consumo	logUFC/g
<i>Input</i>	N <sub>qcon</sub>	=SE(C <sub>qcon</sub> =0;0;SE(C <sub>qcon</sub> <DMP;C <sub>qcon</sub> ;DMP))	Nível de contaminação no momento do consumo	logUFC/g
<i>Input</i>	P	=RiskHistogram(valores não expandidos)	Porções de queijo tipo Minas frescal para adolescentes, adultos e idosos (POF 2008/2009)	(g)
-	Pgt	73%	Prevalência de cepas toxigênicas em queijo tipo Minas frescal (Arcuri, et al., 2010)	%
-	Tox	=SE(N <sub>qcon</sub> ≥5;10^(0,9300751*N <sub>qcon</sub> *Pgt-6,662092;0)	Concentração de enterotoxina A no consumo (Kim et al., 2009)	logng/g
<i>Output</i>	D1	=RiskOutput("Dose de enterotoxina")+(P*Tox)	Dose de (SEA) na porção consumida modelo I	ng/porção
<i>Output</i>	D2	=RiskOutput("Dose de enterotoxina")+ (P*Tox)	Dose de (SEA) na porção consumida do modelo II	ng/porção

Modelo 1: a partir das equações EC1 e Elag 1; modelo 2: a partir das equações EC2 e Elag2

### 3.2.6 Caracterização de risco da exposição a enterotoxina A (SEA)

Neste estudo, assumiu-se que a dose mínima de SEA necessária para causar intoxicação é de 100 ng, estabelecida pelo Ministério da Saúde (MS/Informe nº3, 2012). O risco é dado pela probabilidade cumulativa da ocorrência de eventos de ingestão de SEA pelo consumo de queijo Minas frescal  $\geq 100$  ng.

## 3.3 RESULTADOS

### 3.3.1 Avaliação dos dados

A Tabela 3.2, a seguir, resume o número de amostras de queijo tipo Minas frescal analisadas no período de 2000 a 2012 pelos Laboratórios Centrais (LACENs) que submeteram seus dados à ANVISA ou para a condução deste estudo (Distrito Federal). A maioria das amostras foi analisada pelo LACEN-DF no período 2000-2010. Mato Grosso do Sul e Minas Gerais foram os estados que mais reportaram dados no período 2010-2012.

**Tabela 3.2** Número de amostras de queijo tipo Minas frescal analisadas por Estado, período 2010-2012.

Estado	Número de amostras analisadas	% de amostras (N=400)
Distrito Federal (2000-2012)	211	52,7
Mato Grosso do Sul	50	12,5
Minas Gerais	48	12
Rio de Janeiro	32	8,0
Roraima	31	7,8
Goiás	22	5,5
Maranhão	2	0,5
Santa Catarina	2	0,5
Espírito Santo	1	0,2
Paraná	1	0,2

A Tabela 3.3 apresenta os parâmetros reportados pelos LACENs referentes às amostras de queijo tipo Minas frescal analisadas. No total, 25 parâmetros foram reportados por pelo menos um laboratório.

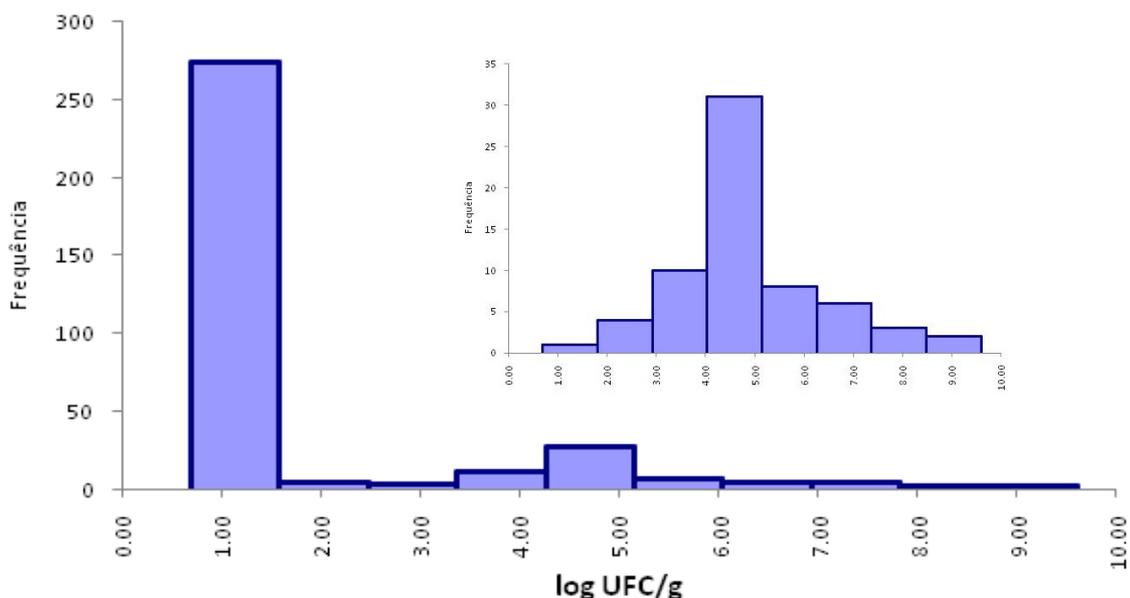
**Tabela 3.3** Parametros analisados em queijo tipo Minas frescal pelos LACENs

<b>Parâmetro</b>	<b>n</b>	<b>% (N=400)</b>
<i>Salmonella</i> spp.	363	90,8
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (SCP)	338	84,5
Coliformes termotolerantes	316	79,0
Tipo de análise*	313	78,3
Local de coleta no estabelecimento	282	70,5
Análise sensorial	272	68,0
Data ou ano da coleta	261	65,3
Data de fabricação	253	63,3
Data de vencimento	244	61,0
Gordura % (p/p)	216	54,0
Peso do produto	208	52,0
Umidade (% p/p)	207	51,8
Temperatura do local de coleta	189	47,3
Dizeres do rótulo	173	43,3
Análise de embalagem	172	43
Nitrato g/100g	118	29,5
Nitrito g/100g	108	27,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	83	20,8
<i>Escherichia coli</i>	74	18,5
Ácido sórbico g/100g	65	16,3
Sódio mg/g	40	10,0
Gordura extrato seco	34	8,5
Toxina estafilocócica (SE)**	24	6,8
Aeróbios mesófilos	10	2,5
<i>Bacillus cereus</i>	5	1,2

\* monitoramento (fiscal e orientação) e surto; \*\* somente presença/ausência

Dentre os parâmetros microbiológicos, 90,8% das amostras analisadas reportaram resultados de *Salmonella* spp, seguido de SCP (84,5% das amostras). Nenhum dos laboratórios reportou resultado de *S. aureus* para as amostras de queijo tipo Minas frescal analisadas. Vinte e quatro amostras foram analisadas para a presença ou ausência de toxina estafilocócica, com dois resultados positivos, sem identificação da toxina nem sua quantificação.

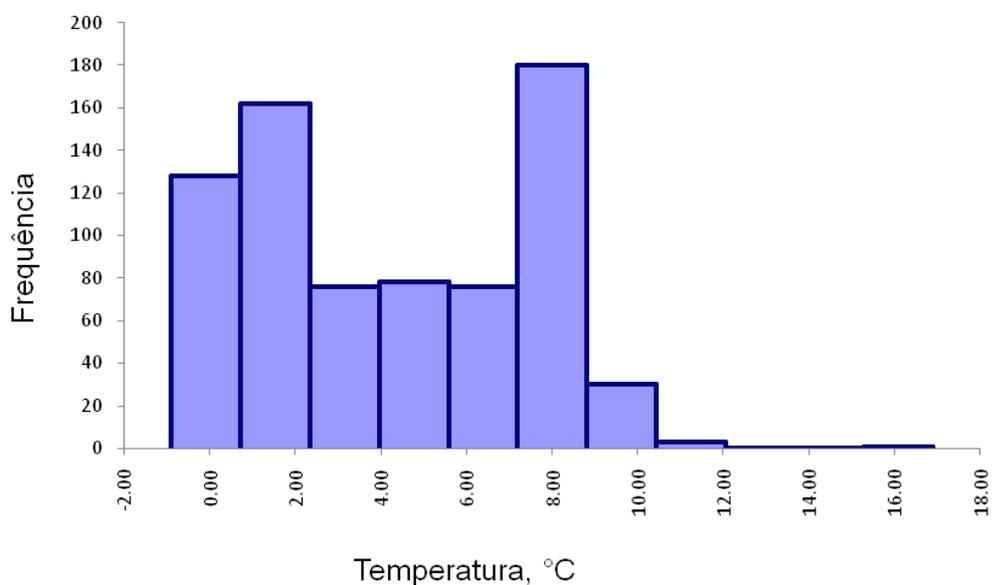
Das 338 amostras de queijo tipo Minas frescal analisadas para SCP, 19,2% ( $P_{iq}$ ) foram reportadas como  $\geq 100$  UFC/g. A Figura 3.1 mostra o histograma dos níveis de contaminação nas amostras analisadas, com mínimo de 1 logUFC/g, moda de 1 logUFC/g e o máximo de 9,6 logUFC/g.



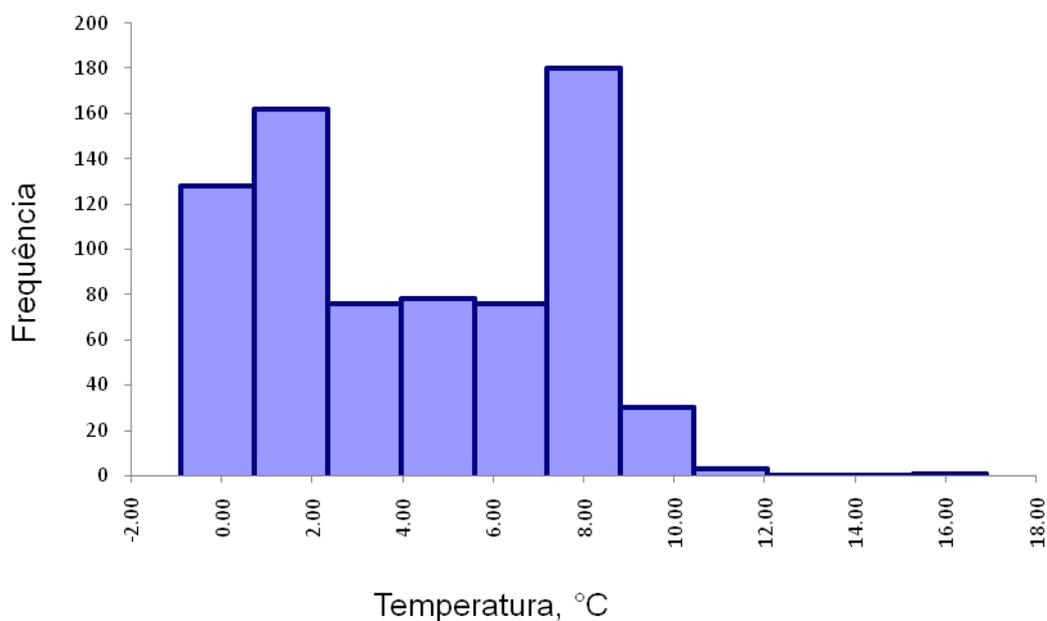
**Figura 3.1** Histograma do nível de contaminação de amostras analisadas para SCP (logUFC/g) (N=338). A figura inserida mostra a distribuição das amostras positivas (N=65)

A Figura 3.2 apresenta o histograma de 734 aferições das temperaturas de um refrigerador comum, no Laboratório de Toxicologia. Estes dados permitem similar cenário de armazenamento do queijo tipo Minas frescal em um refrigerador doméstico até o momento do consumo. A temperatura mínima aferida foi de  $-0,9^{\circ}\text{C}$ , a moda de  $8^{\circ}\text{C}$ , e o máximo de  $17^{\circ}\text{C}$ .

A Figura 3.3 mostra o histograma de pH determinado em queijo tipo Minas frescal referentes a 76 amostras analisadas (Susana Saad, USP). Destes dados foram tirados o mínimo (4,85), a moda (5,5), a mediana (5,8) e o máximo (6,5).

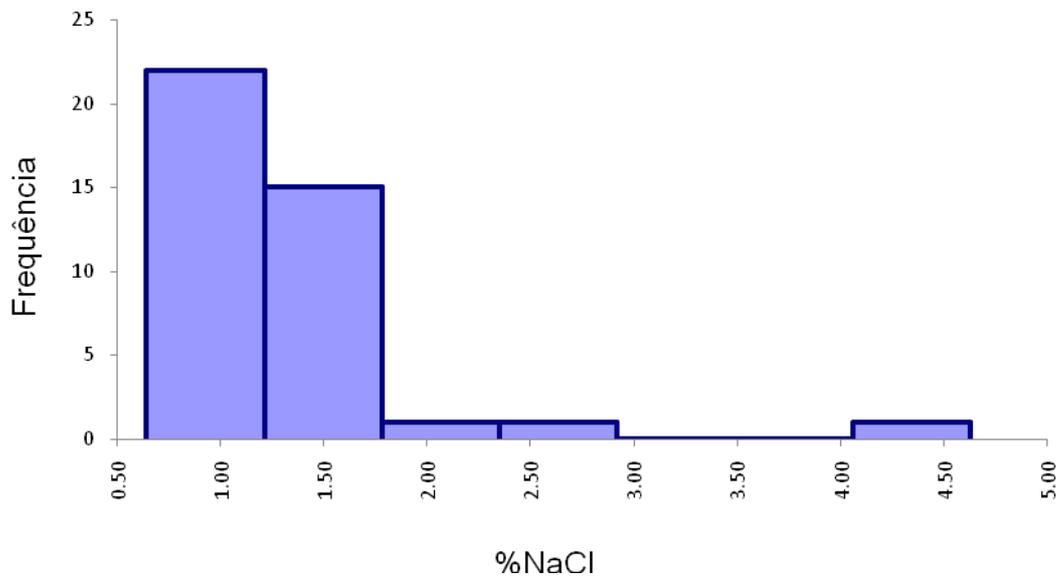


**Figura 3.2** Histograma das temperaturas registradas do refrigerador doméstico do Labtox (N=734)



**Figura 3.3** Histograma dos registros de pH das amostras de queijo tipo Minas frescal (N=76).

A Figura 3.4 mostra o histograma dos valores de % NaCl correspondentes aos dados reportados em 40 amostras de queijo tipo Minas frescal analisadas pelos LACENs. O menor valor encontrado foi 0,64%, com moda de 1,14 % e máximo de 4,63%.



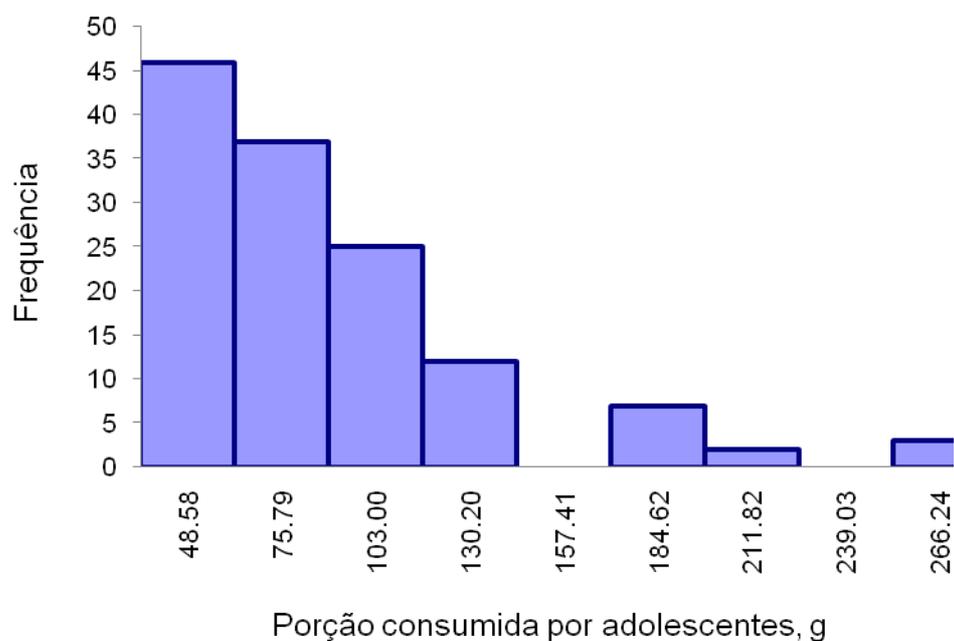
**Figura 3.4** Histograma do %NaCl das amostras de queijo tipo Minas frescal (N=40)

A Tabela 3.4 resume os dados de consumo de queijo tipo Minas frescal obtidos na POF 2008/2009 (POF 7). No total, 1325 indivíduos reportaram o consumo de queijo Minas frescal no Brasil em pelo menos um dia na semana, o que representa 3,9% dos 34003 indivíduos que participaram da pesquisa. A moda da porção consumida em todas populações foi similar (45 g). A menor porção foi reportada pelos adolescentes (35 g) e a maior pelos adultos (405 g).

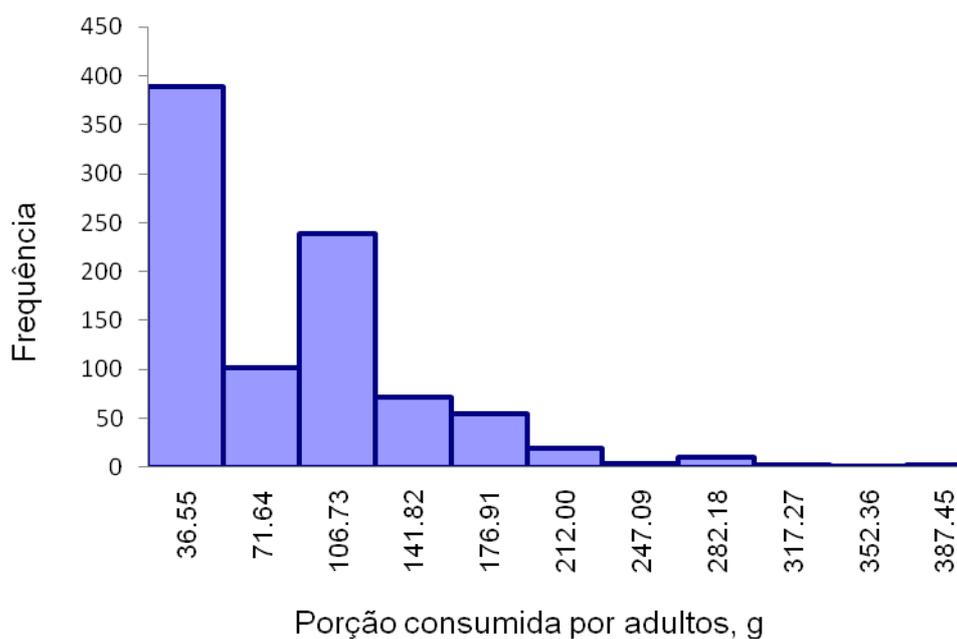
**Tabela 3.4** Informação sobre os valores das porções de queijo tipo Minas frescal para cada faixa etária reportados à POF 2008/2009

População	Idade (anos)	Número de indivíduos	Porções, g Mínima/moda/máxima
Adolescente	10 - 19	132	35/45/280
Adulto	20 - 59	895	19/45/405
Idoso	60 - 91	298	19/45/315

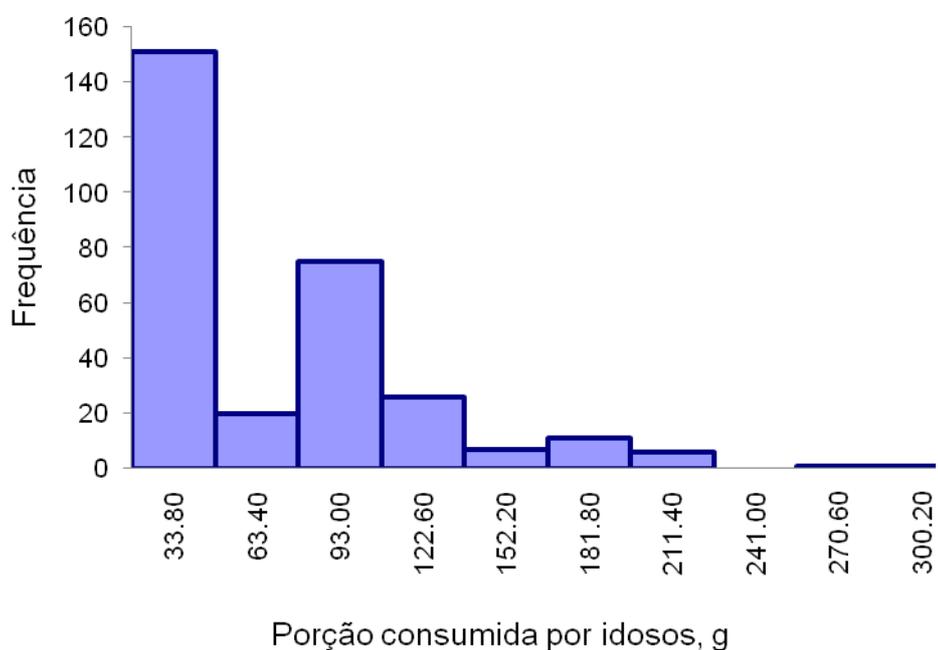
As Figuras 3.5 a 3.7 apresentam os histogramas das porções de consumo de queijo tipo Minas frescal reportados à POF 2008/2009 por adolescentes, adultos e idosos.



**Figura 3.5**– Histograma da porção (gramas) de queijo tipo Minas frescal consumida pela população de adolescentes (N= 132).



**Figura 3.6** Histograma da porção (gramas) de queijo tipo Minas frescal consumida pela população de adultos (N= 895).



**Figura 3.7** Histograma da porção (gramas) de queijo tipo Minas frescal consumida pela população de idosos

A Tabela 3.5 apresenta a moda das temperaturas registradas pelo INMET no período de 2002 a 2011 no Distrito Federal, que foram utilizadas para substituir a informação de temperatura ambiente em cada ano.

**Tabela 3.5** Moda das temperaturas no Distrito Federal registrada pelo Instituto Nacional de Meteorologia.

Ano	Moda da Temperatura
2002	21,4°C
2004	21,3°C
2005	21,7°C
2010	21,8°C
2011	21,6°C

### 3.3.2 Predição de risco de contaminação por rede neural artificial

Das 400 amostras originais, 338 amostras tinham informação sobre enumeração de SCP, das quais somente 92 tinham todas as variáveis relevantes e foram utilizadas na etapa de treinamento. Destas, 78 amostras eram da categoria 1 ( $\leq 1000$  UFC/g), 10 amostras da categoria 2 ( $>1000 < 10^5$  UFC/g), e quatro amostras da categoria 3 ( $\geq 10^5$  UFC/g). A avaliação desta etapa indicou um erro médio de predição de 20%. Para reduzir este erro, uma amostra da categoria 3 foi triplicada no banco de dados, totalizando 94 casos completos, o que resultou num erro de 0%, indicando uma predição adequada dos dados (percentual de probabilidade média incorreta, percentual de previsões inadequadas e desvio padrão da probabilidade incorreta de zero).

A etapa teste foi realizada com os 246 casos incompletos, para os quais os dados ausentes foram preenchidos pela média dos centróides dos grupos de cada variável. Os clusters foram calculados com base nos 94 casos para as seis variáveis independentes. Esta etapa resultou em percentual de previsões inadequadas em 16,7% dos casos, com probabilidade média incorreta de 26,6% e desvio padrão da probabilidade incorreta de 29,3%. Esses valores são menores que o máximo

previsto pelo software (30%), sendo considerados aceitáveis. A previsão da categoria 1 foi adequada em 100% das amostras teste (n=203), e inadequada em 100% das amostras da categoria 2 (n=30). A previsão da categoria 3 (n=13) foi inadequada para 84,6% dos casos. A boa previsão para amostras da categoria 1 era esperada, já que a maioria delas, na fase de treinamento, pertencia a esta categoria (83,0%), e a memória da rede foi mais eficiente. Adicionalmente, os centróides foram produzidos com base nos dados do treinamento. Por outro lado, as categorias 2 e 3 tiveram previsões inadequadas similares (100 e 84,6%) devido ao baixo percentual destas amostras na etapa de treinamento (10,6 e 7,7 % das 94 amostras, respectivamente).

É importante ressaltar que algumas amostras com resultados reportados como >1000 UFC/g, sem enumeração, e classificadas como categoria 2, poderiam pertencer à categoria 3 se tivessem sido analisadas quantitativamente.

O impacto das variáveis independentes nas respostas previstas pela análise de sensibilidade, reportado pelo programa durante a fase de treinamento, está mostrado na Tabela 3.6. Coliformes termotolerantes e peso do queijo declarado foram os parâmetros que mais impactaram no desempenho de predição, mostrando a importância destes dados no modelo de predição. É importante ressaltar que a temperatura da coleta, que teve um impacto de 18,9% no modelo, é um parâmetro fácil de ser obtido durante a coleta da amostra, mas não foi reportado pelos LACENS na maioria para a maioria das amostras (Tabela 3.3).

**Tabela 3.6** Impacto das variáveis independentes sobre a variável dependente na etapa de treinamento.

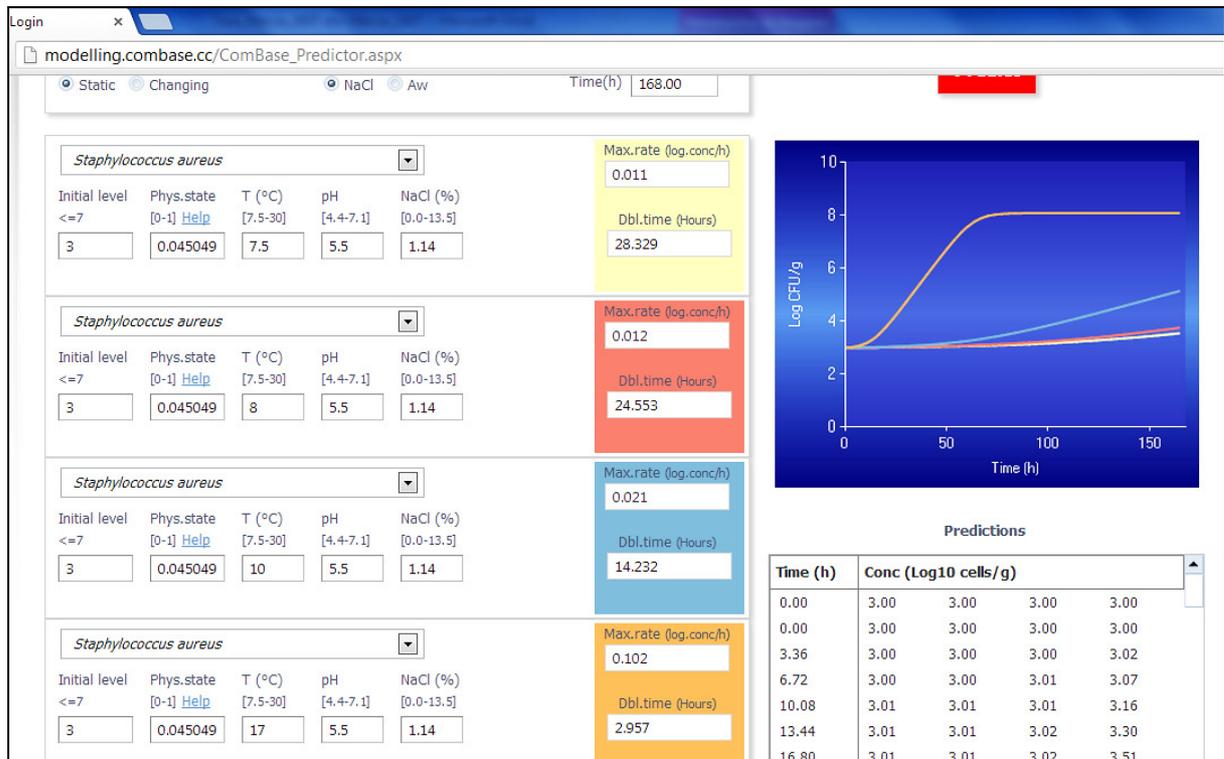
<b>Variável</b>	<b>Impacto</b>
Coliformes termotolerantes	22,9%
Peso (g) do queijo	22,5%
Temperatura na coleta	18,9%
Tempo de fabricação	15,1%
Umidade % p/p	14,2%
Tempo de validade	6,3%

Todas as amostras usadas para testar o modelo preditivo na terceira etapa, de predição eram da categoria 1 (<1000 UFC/g), resultando em 100% de predição adequada, como era esperado. Não foi identificado outros estudos de risco de contaminação utilizando a rede neural para predição de variáveis categóricas, sendo assim não foi possível verificar o desempenho do modelo.

### 3.3.3 Estimativas de taxa de crescimento

#### 3.3.3.1 ComBase

As taxas de crescimento foram estimadas no ComBase a partir de combinações de temperatura, pH, %NaCl e estado fisiológico (EF), assumindo sempre a concentração inicial como 3log e tempo máximo de armazenamento de 7 dias (168 horas). A Figura 3.8 ilustra um *output* do modelo do *ComBase Predictor* nas temperaturas de 7,5; 8; 10 e 17°C, pH 5,5 e 1,14%NaCl. A temperatura mínima nesse programa é de 7,5°C.



**Figura 3.8** Output do ComBase nas temperaturas de 7,5; 8; 10 e 17°C, pH 5,5 e 1,14%NaCl.

As Tabelas 3.7 e 3.8 mostram os parâmetros taxa de crescimento ( $\mu$ ) e fase lag ( $\lambda$ ) obtidos do ComBase nas combinações de pH (5,5; 5,8 e 6,5) e % NaCl (1,1; 1,56 e 4,63) nas temperaturas de 7,5°C, 8°C, 10° e 17°C, nos EF 0,04509, 0,1 e 0,5.

A temperatura de armazenamento foi o parâmetro que mais impactou a taxa de crescimento de *S. aureus*, com maior valor na temperatura máxima de 17°C (0,127; pH 6,5). O pH teve um leve impacto, com maiores valores de  $\mu$  no maior pH. A taxa de crescimento foi menor em 4,63% NaCl, a maior concentração. O estado fisiológico não teve nenhum impacto sobre a taxa de crescimento nas condições testadas.

**Tabela 3.7** Taxa de crescimento ( $\mu$ ), em log UFC/g/hora *S. aureus* obtidas do ComBase variando o estado fisiológico (EF), % NaCl e pH - população inicial de 3 logUFC/g.

pH	EF= 0,04509				EF= 0,1				EF= 0,5			
	7,5°	8°	10°	17°	7,5°	8°	10°	17°	7,5°	8°	10°	17°
<b>NaCl = 1,14%</b>												
5,5	0,011	0,012	0,021	0,102	0,011	0,012	0,021	0,102	0,01	0,012	0,021	0,1
5,8	0,012	0,014	0,024	0,117	0,012	0,014	0,024	0,117	0,012	0,014	0,024	0,116
6,5	0,013	0,015	0,026	0,127	0,013	0,015	0,026	0,127	0,013	0,015	0,025	0,127
<b>NaCl = 1,56%</b>												
5,5	0,01	0,012	0,021	0,1	0,01	0,012	0,021	0,1	0,01	0,012	0,021	0,1
5,8	0,012	0,014	0,024	0,116	0,012	0,014	0,024	0,116	0,012	0,014	0,024	0,116
6,5	0,013	0,015	0,025	0,127	0,013	0,015	0,025	0,127	0,013	0,015	0,025	0,127
<b>NaCl = 4,63%</b>												
5,5	0,008	0,009	0,016	0,08	0,008	0,009	0,016	0,08	0,008	0,009	0,016	0,08
5,8	0,009	0,011	0,019	0,094	0,009	0,011	0,019	0,094	0,009	0,011	0,019	0,094
6,5	0,01	0,012	0,021	0,109	0,01	0,012	0,021	0,109	0,01	0,012	0,021	0,109

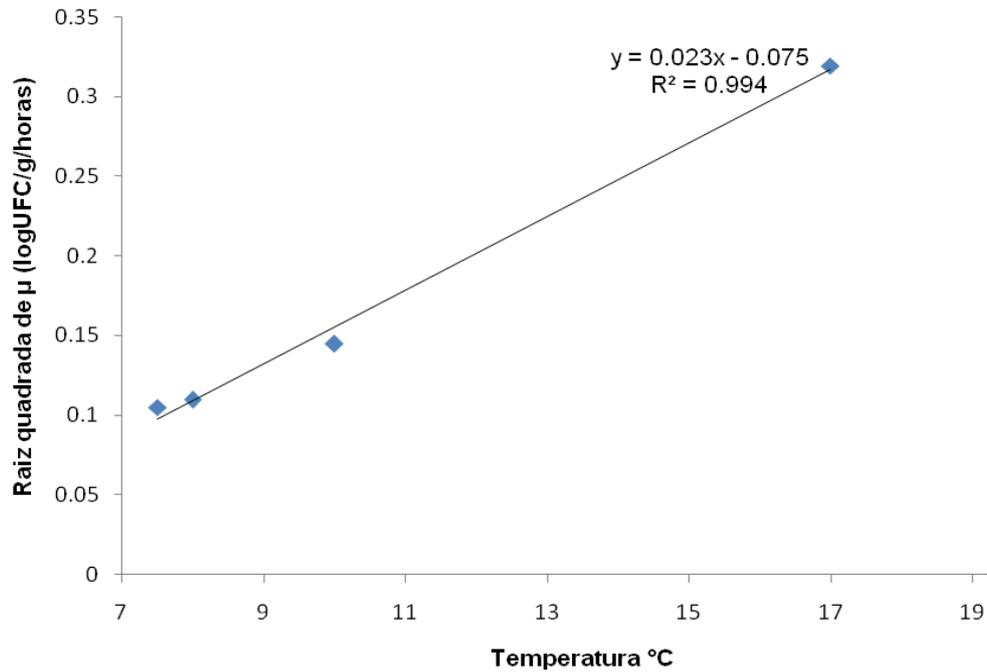
A fase lag estimada pelo ComBase é inversamente proporcional ao estado fisiológico (EF) do inoculo (Eq. 3.2). Este impacto é mostrado na Tabela 3.8, onde a fase lag tem os menores valores com EF= 0,5 (6,8 h em 17°C de temperatura de armazenamento e 1,14% NaCl). A temperatura de armazenamento teve também um

impacto importante na fase lag, com valores decrescendo para cerca de 1/10 quando a temperatura é aumentada de 7,5 para 17°C. Observou-se uma relação inversa da fase lag com pH e uma relação direta com a % NaCl.

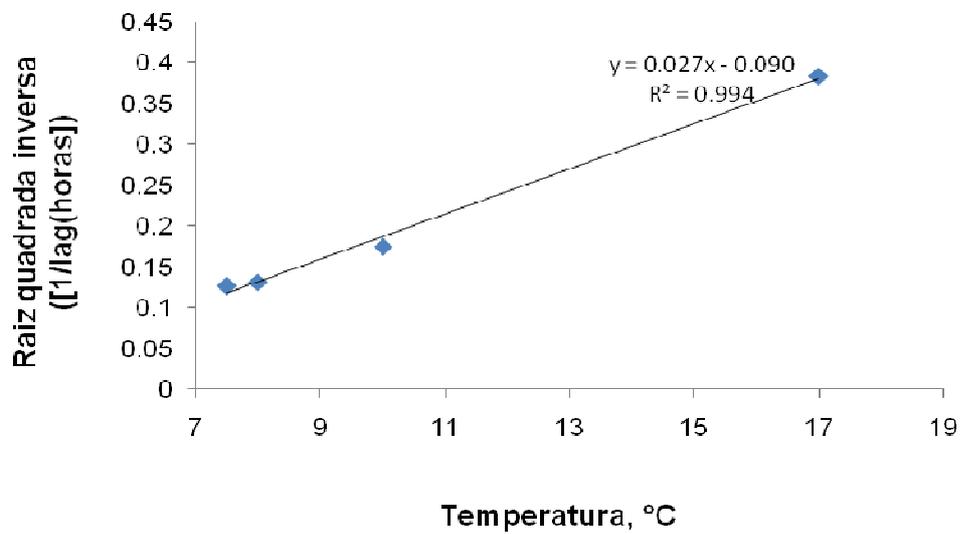
**Tabela 3.8** Fase lag ( $\lambda$ ) (h) em horas para *Staphylococcus aureus* obtidas do ComBase variando o estado fisiológico (EF), %NaCl e pH - população inicial de 3 logUFC/g temp. 7,5; 8, 10 e 17°C.

pH	EF= 0,04509				EF= 0,1				EF= 0,5			
	7,5°	8°	10°	17°	7,5°	8°	10°	17°	7,5°	8°	10°	17°
<b>NaCl = 1,14%</b>												
5,5	281,7	258,3	147,6	30,4	230,2	191,9	109,6	22,6	63,0	57,8	33,0	6,8
5,8	258,3	221,4	129,1	26,5	191,9	164,5	95,9	19,7	57,8	49,5	28,9	5,9
6,5	238,4	206,6	119,2	24,4	177,1	153,5	88,6	18,1	53,3	46,2	26,6	5,4
<b>NaCl = 1,56%</b>												
5,5	309,9	258,3	147,6	31,0	230,3	191,9	109,6	23,0	69,3	57,8	33,0	6,9
5,8	258,3	221,4	129,1	26,7	191,9	164,5	95,9	19,8	57,8	49,5	28,9	6,0
6,5	238,4	206,6	124,0	24,4	177,1	153,5	92,1	18,1	53,3	46,2	27,7	5,4
<b>NaCl = 4,63%</b>												
5,5	387,4	344,3	193,7	38,7	287,8	255,8	143,9	28,8	86,6	77,0	43,3	8,7
5,8	344,34	281,7	163,2	33,0	255,8	209,3	121,2	24,5	77,0	63,0	36,5	7,4
6,5	309,94	258,3	147,6	28,4	230,2	191,9	109,6	21,1	69,3	57,8	33,0	6,3

A Figura 3.9 mostra a correlação entre a temperatura de armazenamento e a raiz quadrada de  $\mu$ , e a equação de crescimento (EC1), considerando pH constante (moda de 5,5) e % NaCl constante (moda 1,14 %). A Figura 3.10 mostra a correlação entre a temperatura de armazenamento e a raiz quadrada do inverso da fase lag ( $\sqrt{1/\text{lag}}$ ) e a equação de duração de fase lag (Elag1), considerando as mesmas condições de pH e % NaCl. Ambas equações mostraram uma boa correlação dos dados ( $R^2 = 0,994$ ).



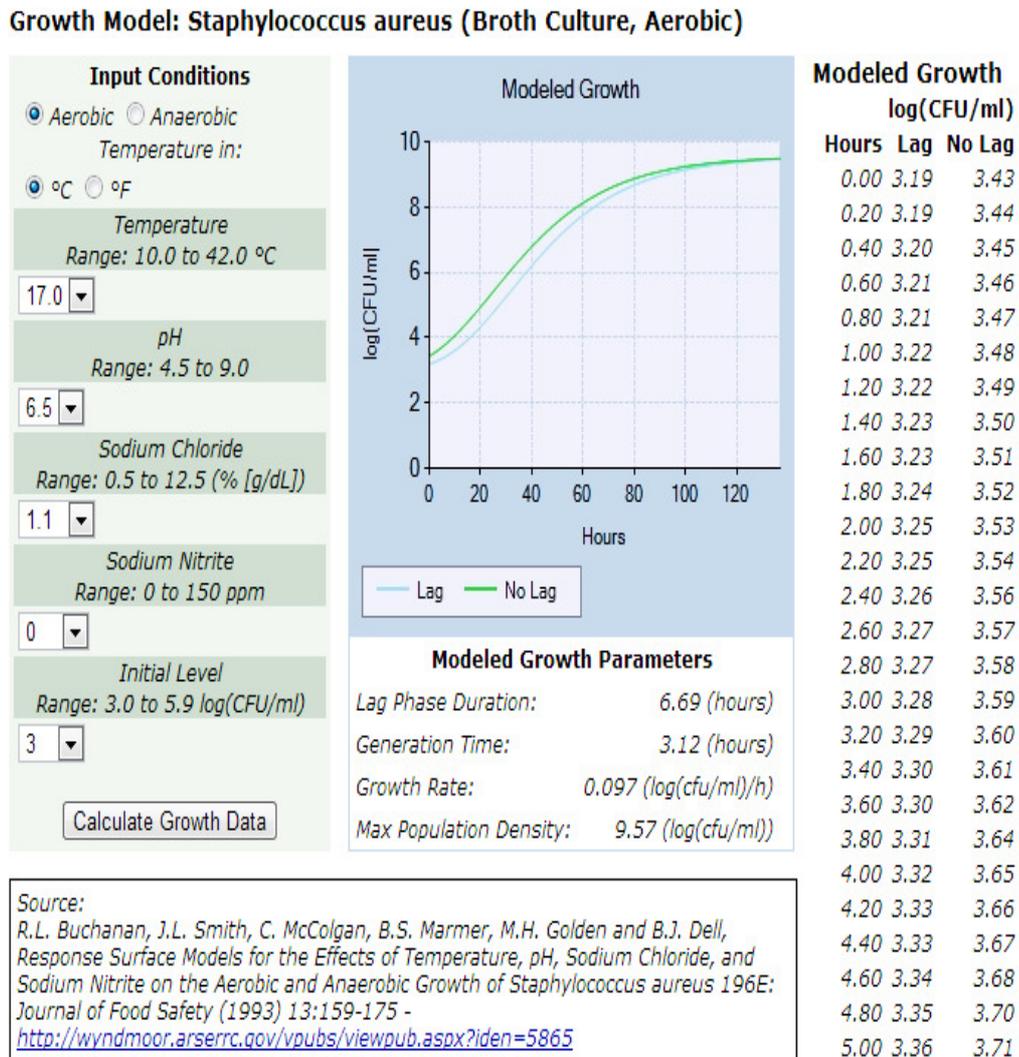
**Figura 3.9.** Equação de crescimento (EC1) em função de temperatura de armazenamento, pH 5,5 e 1,14%NaCl.



**Figura 3.10** Equação de duração de fase lag (Elag1) em função de temperatura de armazenamento, pH, 5,5 e 1,14%NaCl.

### 3.3.3.2 Modelo PMP

As taxas de crescimento foram estimadas no PMP a partir de combinações de temperatura, pH e %NaCl. A Figura 3.11 ilustra um *output* do modelo do PMP para a combinação de valores das variáveis de 17°C de temperatura de armazenamento, pH 6,5 e NaCl1,1% (o mais próximo da moda 1,14) e população inicial de 3 logUFC/g. São estimados a fase lag, tempo de geração, taxa de crescimento e densidade máxima da população (DMP) de *S. aureus*. O modelo não considera o estado fisiológico do micro-organismo e a temperatura mínima é de 10°C.



**Figura 3.11** Ilustração do *output* do PMP na temperatura de 17°C, pH, 6,5 e 1,1%NaCl.

A Tabela 3.9 mostra os parâmetros taxa de crescimento ( $\mu$ ) e fase lag( $\lambda$ ) obtidos do PMP nas combinações de pH (5,5; 5,8 e 6,5) e % NaCl (1,1; 1,5 e 4,5) nas temperaturas de 10°C, 12°C, 14° e 17°C. O maior impacto em ambos os parâmetros foi obtido com o aumento da temperatura, levando a uma maior taxa de crescimento e menor fase lag. O pH teve um impacto maior na fase lag, que aumentou com a concentração de NaCl.

**Tabela 3.9** Taxa de crescimento ( $\mu$ ), e fase lag( $\lambda$ ) obtidas do PMP com população inicial de 3 logUFC/g, temp. 10; 12, 14 e 17°C.

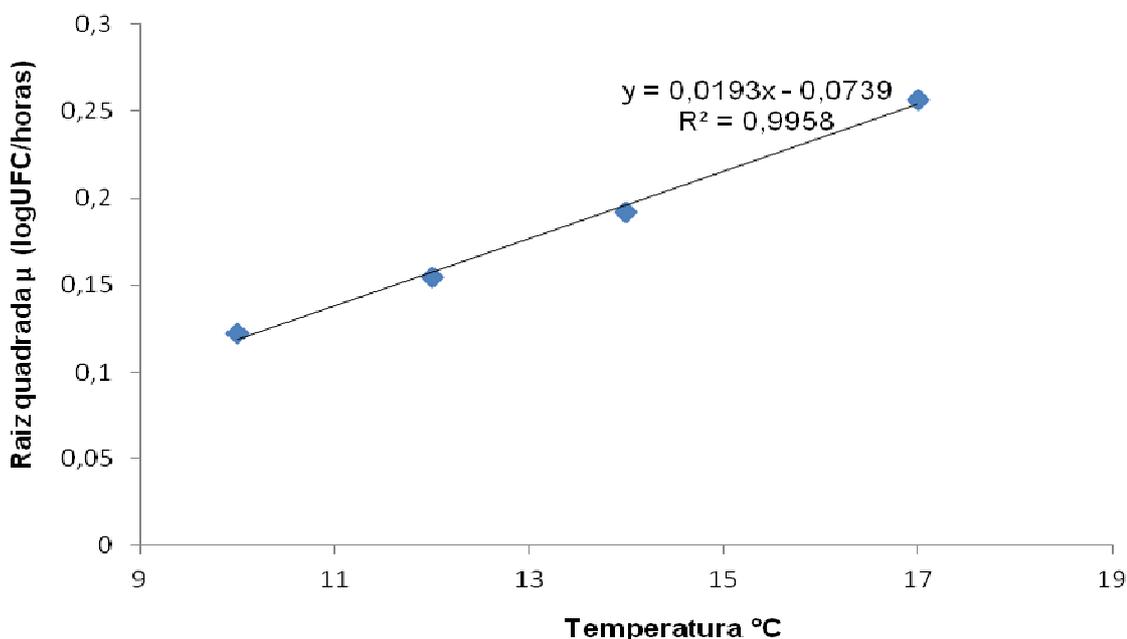
pH	$\mu$ , log UFC/g/h				Fase lag, h			
	10°	12°	14°	17°	10°	12°	14°	17°
<b>NaCl = 1,14%</b>								
5,5	0,015	0,024	0,037	0,066	138,4	73,3	41,0	18,9
5,8	0,018	0,028	0,043	0,077	87,4	46,7	26,28	12,3
6,5	0,023	0,035	0,054	0,037	44,6	24,5	13,93	6,69
<b>NaCl = 1,56%</b>								
5,5	0,014	0,023	0,035	0,062	147,84	78,02	43,41	19,9
5,8	0,017	0,026	0,04	0,072	93,79	49,9	27,99	13,0
6,5	0,021	0,033	0,05	0,09	48,43	26,26	15,01	7,16
<b>NaCl = 4,63%</b>								
5,5	0,08	0,013	0,02	0,038	235,5	129,81	70,09	30,7
5,8	0,009	0,014	0,023	0,043	166,88	86,15	46,89	20,8
6,5	0,011	0,018	0,028	0,052	93,93	49,42	27,41	12,51

A Tabela 3.10 mostra as taxas de crescimento de *S. aureus* obtidas pelos modelos ComBase e PMP nas condições de pH 5,5, 1,1% NaCl e temperaturas 10°C e 17°C, as únicas que foram simuladas em ambos modelos. As estimativas de  $\mu$  foram mais conservadoras no modelo ComBase, e em geral, a fase lag com EF 0,5 no ComBase se aproximam da prevista no PMP, que não considera a EF.

**Tabela 3.10** Resumo das taxas de crescimento ( $\mu$ ) e fase lag obtidas do ComBase e PMP, considerando pH= 5,5, 1,14% NaCl.

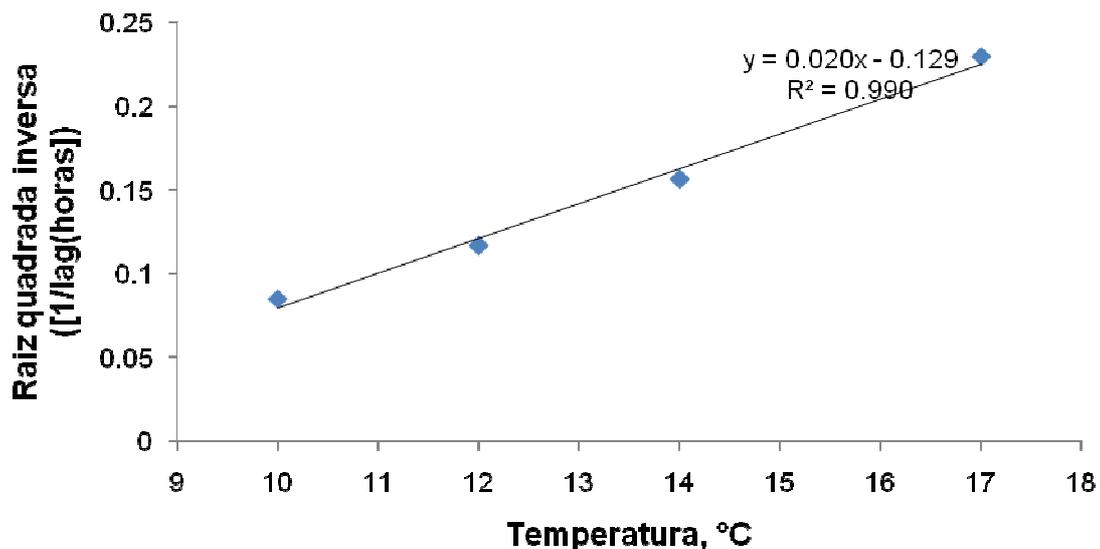
Temperatura, °C	$\mu$ , logUFC/g/h		Fase lag, h	
	ComBase	PMP	ComBase EF 0,045 / 0,1 / 0,5	PMP
10	0,021	0,015	147,6 / 109,6 / 33	41,0
17	0,102	0,066	30,4 / 22,6 / 6,8	18,9

A Figura 3.12 mostra a correlação entre temperatura de armazenamento e a raiz quadrada de  $\mu$ , e a equação de crescimento (EC2), considerando constantes pH (moda de 5,5) e % NaCl (moda 1,1 %). A equação de crescimento mostrou uma inclinação menor que a estimada pelo ComBase ( $0,023x - 0,075$ ), mostrando um crescimento menor do microorganismo com a temperatura.



**Figura 3.12** Equação de crescimento (EC2) em função de temperatura de armazenamento, pH, 5,5 e 1,14%NaCl, no modelo PMP.

A Figura 3.13 mostra a correlação entre a temperatura de armazenamento e a raiz quadrada da duração da fase lag inversa e a equação de duração de fase lag (Elag2), considerando as mesmas condições de pH e % NaCl. Ambas as equações apresentaram boas correlações ( $R^2 > 0,99$ ). A equação de da fase lag mostrou também uma inclinação menor que a estimada pelo ComBase ( $0,027x - 0,075$ ).

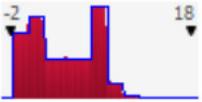
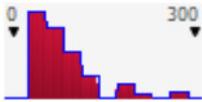


**Figura 3.13** Equação de duração de fase (Elag2) em função de temperatura de armazenamento, pH, 5,5 e 1,1%NaCl.

### 3.3.4 Avaliação da exposição à enterotoxina A estafilocócica (SEA) pelo consumo de queijo tipo Minas frescal

A Tabela 3.11 resume os dados de *input* dos modelos I e II. O modelo I considerou a taxa de crescimento e tempo de fase lag obtidos do ComBase (EC1 e Elag1) e o modelo II os dados do PMP (EC2 e Elag II). Em ambos os casos assumiu-se 1,1% NaCl e pH 5,5. O tempo de armazenamento variou entre 1 e 168 horas.

**Tabela 3.11** Resumo dos dados de *input* dos modelos I e II para *S. aureus* em queijo Minas frescal

Nome	Gráfico	Mínimo	Média	Máximo	5%	95%
Piq (prevalência inicial de <i>S. aureus</i> )		0	0,192	1	0	1
Cqi (concentration inicial de <i>S. aureus</i> , log UFC/g)		0,699	1,86	9,60	0,75	5,41
T (temperatura de armazenamento, °C)		-0,900	4,23	16,90	-0,44	8,78
T (tempo, h)		1,000	84,54	168,0	9,466	159,7
Porção de queijo, adolescente (g)		19,00	85,61	405,0	23,04	190,2
Porção de queijo, adulto (g)		34,98	88,55	279,84	38,86	192,1
Porção de queijo, idoso (g)		19,00	72,00	315,0	21,93	178,0

A concentração de SEA na amostra (ToxSEA) foi estimada para os modelos I e II. A ToxSeA foi maior que zero quando a concentração de *S. aureus* no queijo minas frescal no momento do consumo foi maior que 5log UFC/g (dose mínima para produção de toxina). Considerou-se também que 73% das cepas de *S. aureus* presentes nas amostras de queijo analisadas pelos LACENs são toxigênicas (Arcuri et al., 2010) (Tabela 3.1). A exposição da população a SEA pelo consumo de queijo Minas frescal (Dose de ingestão) é dada equação 3.4.

$$\text{Dose de ingestão} = \text{Porção consumida} \times \text{ToxSEA} \quad (\text{Eq. 3.5})$$

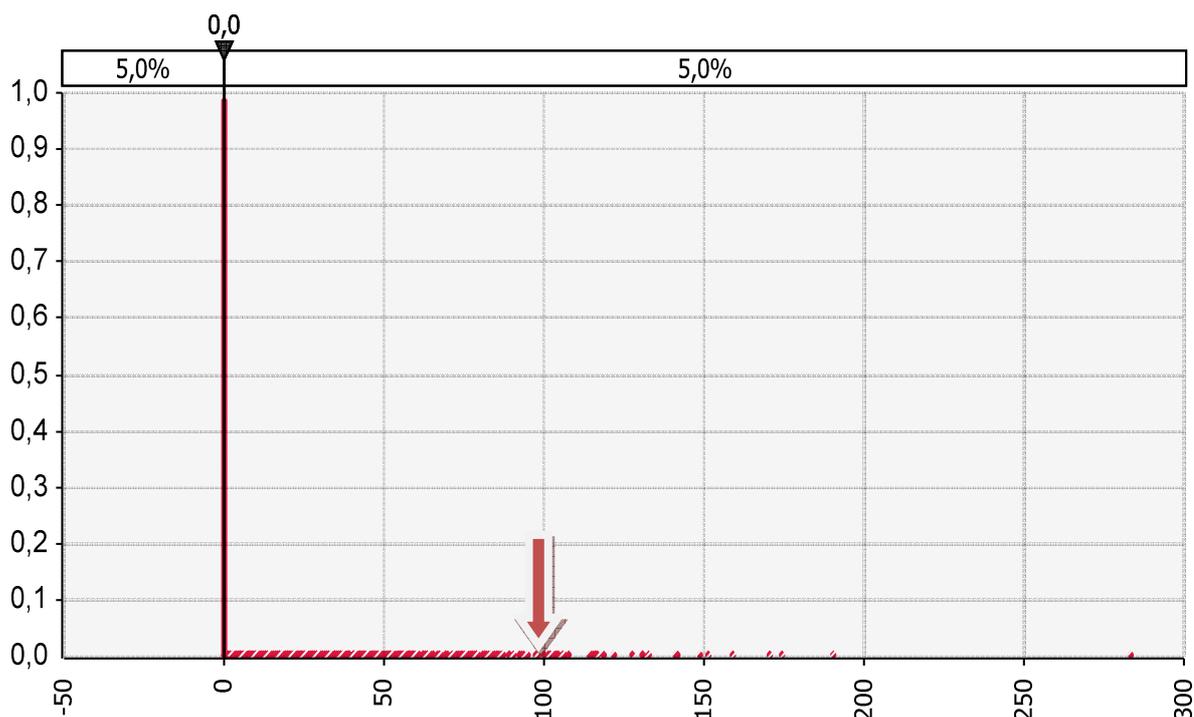
A Tabela 3.12 mostra as doses que resultaram da avaliação da exposição a SEA pelo consumo de queijo Minas frescal para as populações do estudo estimada pelo @risk. A dose máxima obtidas utilizando as equações de taxa de crescimento e fase log do ComBase foi cerca de 10% maior que aquela obtida com as equações do PMP para adolescente, mas menores que aquelas obtidas para adultos e idosos. Os níveis máximos de exposição ocorreram para adolescentes em ambos os modelos (283,2 e 249,6 ng/porção para PMP e ComBase, respectivamente). Para esta população, a dose tóxica (100 ng) é ultrapassada com probabilidade de 0,99997, ou 3 intoxicações/100.000. Para adultos, esta probabilidade é de 2 intoxicações/100.000 e para idosos, 1 intoxicação/100.000. As estimativas de risco foram similares em ambos os modelos.

**Tabela 3.12** Níveis de exposição a SEA, em ng/porção de queijo tipo Minas frescal, para adolescentes, adultos e idosos estimados nos modelos ComBase e PMP.

	ComBase			PMP		
	Adolesc.	Adulto	Idoso	Adoles.	Adulto	Idoso
Mínimo	0,00	0,00	00,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	283,2	177,84	152,32	249,6	192,4	171,9
Média	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
DP	1,33	1,29	1,1	1,4	1,3	1,14
Variância	1,8	1,6	1,2	1,9	1,7	1,3
P <sub>&gt;100 ng</sub> *	0,99997	0,99998	0,99999	0,99997	0,99998	0,99999

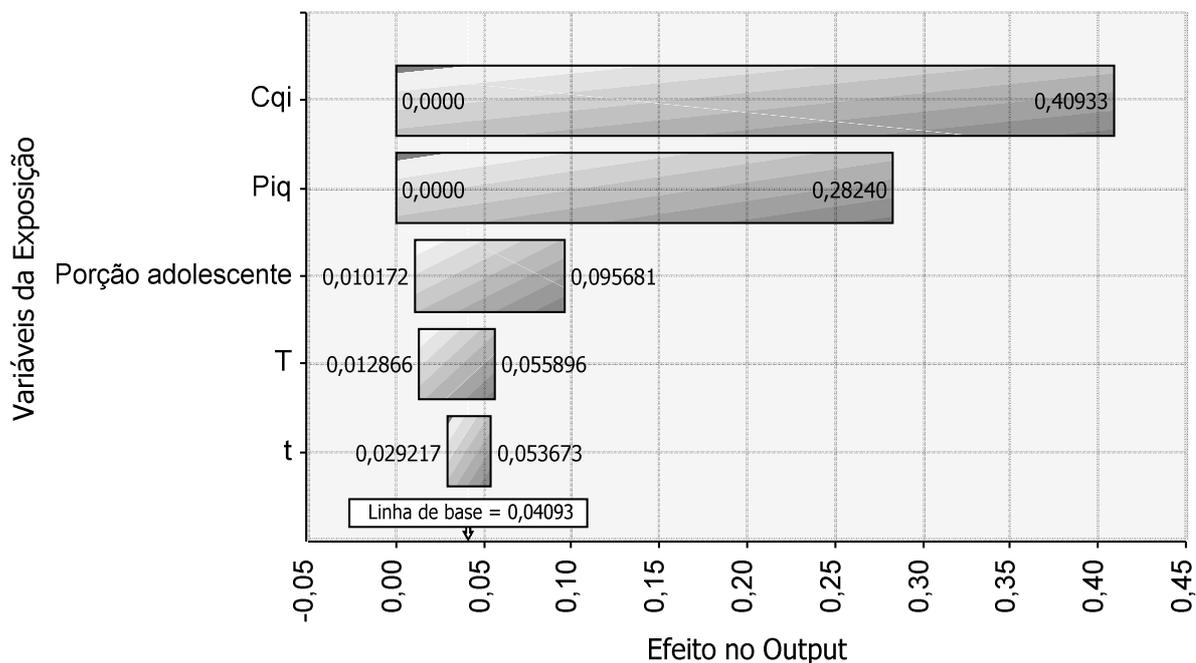
\* percentil no qual a dose foi maior que 100ng/porção; DP= desvio padrão;

A Figura 3.14 mostra os eventos onde a ingestão de SEA ultrapassa a dose segura (100 ng) para adolescentes no modelo I (ComBase). O perfil destes eventos foi similar para adultos e idosos. Como a frequência de amostras positivas foi baixa (19,2%), a grande maioria dos eventos aleatórios amostrados pelo @risk foi de dose 0.



**Figura 3.14** Eventos de ingestão entre 0 e 283,2g, para o grupo de adolescentes no modelo I estimados pelo @risk (Palisade®)

As Figuras 3.15 mostra os resultados da análise de sensibilidade dos efeitos de cada *input* no *output* da média da dose de SEA obtidos do modelo I (ComBase) para adolescentes. O parâmetro que mais impactou a dose estimada foi a concentração inicial no queijo tipo Minas frescal ( $C_{qi}$ ), seguido da prevalência de amostras positivas ( $\geq 100$  UFC/g). Este resultado foi similar para as outras populações e para o modelo PMP.



**Figura 3.15** Gráfico de tornado do efeito do *input* no *output* da Dose de exposição a SEA para o grupo de adolescentes pelo consumo de queijo tipo Minas frescal, de acordo com modelo 1 (ComBase).

### 3.4 DISCUSSÃO

Este estudo permitiu levantar os dados disponíveis de análise de queijo tipo Minas frescal realizadas pelos laboratórios centrais estaduais e do Distrito Federal. Considerando que estes dados devem refletir as ações de vigilância no Brasil, pode-se inferir que o número de amostras foi limitado. Adicionalmente, vários parâmetros não são reportados por vários laboratórios, o que torna o banco de dados incompleto, faltando informações consideradas essenciais para a condução de avaliação de risco, como temperatura de armazenamento, pH e % NaCl. Apenas 47,3% das amostras apresentavam dados de registro da temperatura no local de coleta, o que impossibilita determinar se a qualidade microbiológica é consequência das práticas de fabricação ou se foi devido ao armazenamento inadequado no estabelecimento comercial. Resultados de SCP não foram reportados para 15,5%

das amostras analisadas pelos LACENs, parâmetro que é previsto na legislação brasileira para queijo Minas frescal. Nesse estudo, consideramos os resultados de SCP como refletindo os níveis de *S. aureus*, já que esta informação não estava disponível. Esta é uma suposição conservadora, mas necessária na avaliação de risco. Nos programas de monitoramento no país, análise de toxina no alimento é feita somente nos casos de suspeita de intoxicação stafilocócica, mesmo que o nível de contaminação seja alto. Nenhuma amostra analisada continha informação de SE.

Os dados de SCP gerados pelos LACENs possuem várias incertezas, e podem não refletir exatamente a qualidade microbiológica dos queijos tipo Minas frescal disponíveis no comércio. Várias amostras foram reportadas apenas como  $\geq 1000$  UFC/g, que não reflete a verdadeira distribuição da contaminação de SCP de cada amostra. A falta de alguns dados e de resultados quantitativos de SCP em algumas amostras limitou a capacidade de predição de risco contaminação da rede neural artificial para casos da categoria 2 e 3 (acima de 1000 UFC/g).

Os modelos preditivos de crescimento ComBase e PMP foram utilizados para estimar as taxas de crescimentos e duração da fase lag nas condições físico-químicas escolhidas (pH 5,5; NaCl 1,1%). Esses modelos também foram utilizados nos estudos de risco de *S. aureus* de Lindqvist et al. (2002), Heidinger et al. (2009) e Yoon et al. (2011). O uso dos modelos preditivos constitui uma incerteza nesses modelos de risco, pois não consideram a microbiota competidora e a expressão dos genes enterotoxigênicos em diferentes combinações de fatores intrínsecos e extrínsecos, nem a presença de antimicrobianos e aditivos, nas diferentes matrizes de alimento. Portanto as taxas de crescimento podem estar superestimadas, porém, isso beneficia os modelos de risco conservadores.

As condições de crescimento de *S. aureus* escolhidas para o modelo do estudo, pH 5,5 e 1,1%NaCl refletem a condição mais comum de um queijo tipo Minas frescal. O pH 5,5 é o valor mais frequente (moda) dos valores reportados é similar com os achados na literatura (Rocha et al., 2006; Carvalho et al., 2007; Brito et al., 2008; Ribeiro et al., 2009; Tsutsuura, Murata, 2013). As doses de exposição estimadas nas diferentes faixas etárias foram influenciadas principalmente pela concentração de *S. aureus* inicial e a prevalência inicial. Esse fato constata a necessidade de um monitoramento constante dos níveis de contaminação de amostras de queijos tipo Minas frescal para uma avaliação de risco mais efetiva.

Neste estudo, a probabilidade na população brasileira de ingerir SEA em níveis superiores à dose tóxica pelo consumo de queijo tipo Minas frescal, armazenado sob refrigeração, em até 7 dias após sua aquisição, é de no máximo, 0,99997, com risco de intoxicação de  $3 \times 10^{-5}$  ou, 3 casos/100.000 habitantes, e pode ser considerada baixa. Este nível de risco foi menor que o encontrado por Lindqvist et al. (2002), na Suécia, para queijo fresco com pH menor de 5,2 ( $5 \times 10^{-3}$ ), com limite mínimo considerado de 6 logUFC/g. Os autores encontraram um risco quase 10 vezes maior para queijo fresco com pH 6,5. Riscos similares foram encontrados para leite na Etiópia,  $1,1 \times 10^{-3}$ , considerando a dose tóxica como 20 ng (Makita et al., 2012). Nos Estados Unidos, Heidinger et al. (2009) encontrou eventos de doses de 94 ng e níveis de contaminação  $\geq 5$  logUFC/g de enterotoxina, representando um risco de  $1 \times 10^{-1}$  pelo consumo de leite cru.

Risco de intoxicação pela ingestão de SEA entre  $10^{-4}$  e  $10^{-2}$  foi identificado em outros estudos pelo consumo de kimbab, uma espécie de sushi consumido na Coreia (Rho, Schaffner, 2007; Yoon et al. 2011), de carne de porco (Kim et al. 2009) e de salada de rabanete (Lee, Park, 2008). A concentração inicial de *S. aureus* também foi considerada o fator mais importante na estimativa da dose de exposição nestes estudos.

O risco da exposição a SEA depende diretamente do limite da dose tóxica, a qual é determinada a partir de estudos clínicos e epidemiológicos. Alguns estudos consideraram a dose tóxica de 20 ng na caracterização do risco (Kim et al. 2009; Makita et al. 2012), mais conservadora que a considerada neste estudo (100 ng), adotada pelo Ministério da Saúde. É importante a condução de estudos epidemiológicos leve em consideração o patógeno e as características da população brasileira, os quais podem acessar dados de severidade (morbidade e mortalidade) para agregar uma sensibilidade diferenciada aos grupos etários. A importância de acessar a dose de exposição capaz de causar intoxicação é importante para se determinar o nível adequado de proteção sanitária (ALOP).

Essas incertezas levam a sugerir as principais mudanças no processo de avaliação de risco em saúde pública, que deve ter início nos programas de monitoramento (OPAS, 2008). Este monitoramento deve ocorrer nos estabelecimentos produtores de leite e derivados, fiscalização rigorosa dos instrumentos de controle de temperatura dos locais de armazenamento de produtos,

a implementação de método de detecção mais sensíveis de patógenos, junto às metodologias de enumeração e análise de enterotoxinas em todas as amostras com enumeração de SCP  $\geq 5$  logUFC/g. À medida que estas incertezas são reduzidas, a avaliação de risco é mais factível e possibilita detectar os fatores que influenciam esses níveis e implementar modelos de mitigação dos riscos para a saúde pública.

A mitigação dos riscos compreende o envolvimento de todos os autores responsáveis pela segurança alimentar. A produção do queijo tipo Minas frescal tem início nas fazendas que coletam o leite das vacas, de onde é possível levantar fatores de risco da contaminação do leite, ligados a saúde animal e ocorrência de mastites, higiene do ambiente e dos manipuladores, condições de transporte do leite das fazendas e cooperativas aos laticínios e controle dos pontos críticos. Na produção de queijos, é possível mitigar o risco de enterotoxinas com o uso de culturas de bactérias lácticas que reduzem a taxa de crescimento de *S. aureus* e reduzem o pH ao nível de não-crescimento, aliado ao controle da temperatura de armazenamento (Carvalho et al., 2007; Chioda et al., 2007; Alomar, et al., 2008; Rosengren, et al., 2013).

## CONCLUSÕES

- Houve um decréscimo importante no número de amostras analisadas pelo LACEN-DF a partir de 2001.
- As análises não incluem todos os parâmetros previstos na legislação e outros que poderiam auxiliar na elucidação dos surtos, como identificação e numeração de *S. aureus* e detecção de suas toxinas.
- Nem todos surtos foram investigados pelo NATHA-DF, e apenas 63% foram concluídos.
- Em apenas 12,8% dos surtos investigados foram concluídos utilizando o resultado da análise do alimento envolvido. Porém, não foi possível relacionar as amostras desses alimentos com aquelas analisadas pelo LACEN-DF
- Dados de análise de queijo Minas frescal reportados pelos LACENs mostraram-se insuficientes para vários parâmetros, levando a uma limitação da aplicação da rede neural probabilística para prever risco de contaminação por SCP.
- As equações de crescimento estimadas pelo modelo ComBase e PMP foram similares.
- A concentração inicial e a prevalência de *S. aureus* são as variáveis de maior impacto na avaliação do risco.
- O risco da exposição a SEA pelo consumo de queijo frescal no Brasil de 3/100.000 (casos/população) foi menor que as encontradas em estudos reportados em outros países pelo consumo de queijo e leite.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação de risco é um processo complexo que envolve todos os gestores da segurança alimentar com o objetivo de promoção da saúde pública. Este tipo de avaliação responde aos questionamentos dos fatores implicados nos níveis de contaminação que subsidiam as medidas de controle dos patógenos em toda cadeia alimentar, bem como a definição dos critérios microbiológicos pela legislação brasileira, que visa a inocuidade dos alimentos.

Sua precisão refere-se ao maior número de informações obtidas das etapas que compõe o fluxograma do alimento, desde a produção primária até o consumo e, acima de tudo, aos estudos científicos disponíveis de microbiologia preditiva,

detecção e enumeração com limites de quantificação definidos e resultados fidedignos que não se limitam a reportar conformidade e não conformidade com o critério microbiológico da legislação vigente, estudos epidemiológicos que norteiam a dose tóxica, e os estudos de padrão de consumo dos alimentos.

Portanto, a presente pesquisa deve repercutir em melhorias junto ao Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF) e em outros Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs) do Brasil, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), onde é possível listar os seguintes aspectos:

- a) sensibilização dos setores de manutenção de insumos e qualificação dos recursos humanos para continuidade, e, além disso, implementação de novas análises de alimentos de rotina, e envolvidas em doenças transmitidas por alimentos (DTA);
- b) maior incentivo ao treinamento dos servidores dos LACENs para a utilização de ferramentas estatísticas de investigação de surtos, modelagem preditiva e simulação para avaliação de risco propriamente dita;
- c) parcerias das vigilâncias sanitárias com a fiscalização e monitoramento da produção primária, a fim de que os parâmetros analisados de amostras de queijos, em todas as etapas da cadeia alimentar, sejam analisados em conjunto e efetivamente, realizando-se a avaliação de risco que dará suporte para a gestão do risco e as medidas de mitigação mais adequadas em cada etapa;
- d) pactuação do fluxo e obrigatoriedade da notificação dos surtos de DTA, a exemplo do que ocorre em embarcações, em alto mar, com objetivo de reduzir a subnotificação;
- e) gestão e comunicação transparente do risco, sendo publicada em boletim eletrônico, *internet* e *intranet*, a exemplo dos dados reportados de surtos;
- f) adição dos registros do consumo das crianças entre 0 e 9 anos de idade, ao inquérito da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF), a fim de compor a avaliação de risco da população.

## REFERÊNCIAS

- Abdou, M.A., Awny, N.M., Abozeid, A.A-E.M. (2012). Prevalence of toxicogenic bacteria in some foods and detection of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* enterotoxin genes using multiplex PCR. *Annals Microbiology* 62, 569–580.
- Acheson, D.W.K.. (1992). Enterotoxins in acute infective diarrhoea. *Journal of Infection* 24, 225-245.
- Akineden, Ö., Annemüller, C., Hassan, A.A., Lämmner, C., Wolter, W., Zschöck, M. (2001). Toxin genes and their characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8, 959-964.
- Alomar, J. Lebert, A., Montel, M.C. (2008). Effect of temperature and pH on growth of *Staphylococcus aureus* in co-culture with *Lactococcus garvieae*. *Current Microbiology* 56, 408-412.
- Andrade, U.V.C., Hartmann, V., Masson, M.L. (2009). Isolamento Microbiológico, Contagem de Células Somáticas e Contagem Bacteriana Total em Amostras de Leite. *ARS VETERINARIA* 25, 129-135.
- André, M.C.D.P.B, Campos, M.R.H., Borges, L.J., Kipnis, A., Pimenta, F.C., Serafini, A.B. (2008). Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and minas frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. *Food Control* 1, 200–207.
- ANVISA (2013). (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Programa Nacional de Monitoramento da Qualidade Sanitária de Alimentos. 2013. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/programa/index.htm>. Acesso em 30/04/2013.
- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, DC: American Public Health Association (APHA).
- Araújo, V.S., Pagliares, V.A., Queiroz, M.L.P. Freitas-Almeida, A.C. (2002). Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 1172–1177.
- Arcuri, E.F., Angelo, F.F., Guimarães, M.F., Talon, R., Borges, M.D.E., Leroy, S., Loiseau, F., Lange, C., Andrade, N. J., Montet, D. (2010). Toxigenic status of

- Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and minas frescal cheese in Brazil. *Journal of Food Protection* 73, 2225-2231.
- Argudim, M.A., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R. (2010). Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxin* 2, 1751-1773.
- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Nozaki, S. (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection* 130, 33–40.
- Ávila, R., Andrade, R.B., Júnior D.R.M., Rabelo, R.P., Silva, M.R. (2010). Práticas higiênico-sanitárias na manipulação de alimentos: diagnóstico e intervenção. *Comunicação em Ciências de Saúde* 2, 107-116.
- Bahk, G-J.; Hong, C-H.; OH, D-H.; HÁ, S-D.; Park, K-H.; Todd, E. C. D. (2006). Modeling the level of contamination of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat kimbab in Korea. *Journal of Food Protection* 69, 1340-1346.
- Bandeira, F.S., Picoli, T., Zani, J.L., Silva, W.S., Fischer, G. (2013). Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica, na região sul do Rio Grande do Sul. *Arquives in Biology* 80, 1-6.
- Baranyi, J. Tamplin, M.L. (2004). ComBase: A Common Database on Microbial Responses to Food Environments. *Journal of Food Protection* 67, 9, 1967-1971.
- Baranyi, J., Roberts, T. (1994). A dynamics approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of food Microbiology* 23, 277-294.
- Bemrah, N. Sanaa, M., Cassin, M.H., Griffiths, M.W., Cerf, O. (1998). Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. *Preventive Veterinary Medicine* 37, 129-145.
- Bemrah, N., Berges, H., Comin, C., Beaufor, A., Milleman, Y., Dufour, A., Benet, J.J., Cef, O., Sanaa, M. (2003). Quantitative risk assessment of human salmonellosis from the consumption of a turkey product in collective catering establishments. *International Journal of Food Microbiology* 80, 17- 30.
- Bergdoll, M.S. Monkey Feeding Test for Staphylococcal Enterotoxin. (1988). *Methods in enzymology* 165.
- Boari, C. A.; Marques, S. C.; Nascimento, A. R.; Alcântara, E. M. C.; Picooli, R. H. (2004). Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de tortas doces, comercializadas no município de Lavras, MG. *Higiene Alimentar* 18, 98-102,

- Braga, A.P. Carvalho, A.P.de L.F. de, Ludermir, T. B. (2007). Redes neurais artificiais, teoria e Aplicações, 2.ed., Rio de Janeiro: editora Gen/LTC., 224p.
- Brant, L. M. F.; Fonseca, L. M.; Silva, M. C. C. (2007). Microbiological quality of artisanal Minas cheese, manufactured in the region of Serra-MG. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 59, 1570-1574.
- Brasil (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). (1996). Portaria nº. 146, de 07 de março de 1996. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>. Acesso em: 10/03/ 2013.
- Brasil (RDC 12 de 22 de janeiro de 2001) (2001). Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC\\_12\\_2001.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES). Acesso em: 30/05/2013.
- Brasil (2010). Ministério da Saúde. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Editora MS, 2010. 158p.
- Brasil (2012). Boletim de Vigilância Laboratorial das Enterotoxinas estafilocócicas, Informe nº. 3. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_enterotoxinas\\_estafilococicas\\_inf\\_3.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_enterotoxinas_estafilococicas_inf_3.pdf). Acesso em: 10/03/2013.
- Brasil (2013). Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica, dados Epidemiológicos, DTA período de 2000 a 2011. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1550](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1550). Acesso em: 30/05/2013.
- Brito, J.R.F., Santos, E.M.P., Arcuri, E.F., Lange, C.C., Brito, M.A.V.P., Souza, G.N., Cerqueira, M.M.P.O., Betran, J.M.S., Call, J.E., Liu, Y., Porto-Fett, A.C.S., Luchansky, J.B. (2008). Retail survey of Brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* Isolate. Applied and Environmental Microbiology 74, 4954-4961.
- Buchanan, R.L., Smith, J.L., Long, W. (2000). Microbial risk assessment: dose-response relations and risk characterization. International Journal of Food Microbiology 58, 159-172.

- Burlingame, B., Pineiro, M. (2007). The essential balance: risks and benefits in foods safety and quality. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 139-146.
- CAC (Codex Alimentarius) (1999). Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment, CAC/GL-30. Disponível em <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/cac1999/en/>. Acesso em: 30/03/2012.
- CAC (Codex Alimentarius) (2003). Recommended international code of practice General principles of food hygiene. Disponível em: <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/importedfoods/guideline/dl/04.pdf>. Acesso em: 20/03/2012.
- Carmo, L.S., Dias, R.S, Linardi, V.R., Sena, M.J., Santos, D.A Faria, M.E., Castro, E.P., Jett, M., Heneine, L.G. (2002). Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology* 19, 9-14.
- Carmo, L.S., Dias, R.S, Linardi, V.R., Sena, M.J., Santos, D.A. (2003). An Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning in the Municipality of Passos, MG, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46, 581-586.
- Carmo, L.S, Cummings, C., Linardi, V.R., Dias, R.S., Souza, J.M., Sena, M.J., Santos, D.A., Shupp, J.W., Pereira, K.P., Jett, M. (2004). Case Study of a Massive Staphylococcal Food Poisoning Incident. *Foodborne pathogens and disease* 1, 241-246.
- Carmo, G.M.I.C., Oliveira, A.G., Domech, C.P., Santos, D.A., Almeida, M.G., Berto, L.H., Alves, R.M.S., Carmo, E.H. (2005). Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 – 2004. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. *Boletim Epidemiológico* 6, 1-7.
- Campos, M. R. H., Kipnis, A., Porfírio, M. C. D., Borges, A. (2006). Phenotypic characterization by antibiogram of *Escherichia coli* strains isolated from handlers, raw milk and “minas Frescal” cheese samples in a dairy process plant in Goiás, Brazil. *Ciência Rural* 36, 1221-1227.
- Cardoso, R. C. V., Almeida, R. C. C., Guimarães, A. G., Goes, J. A. W. G., Santana, A. A. C., Silva, S. A., Junior, P. O. V., Brito, L. (2010). Microbial quality assessment of ready-to-eat foods served at schools supported by the National Scholar Food Supply Program. *Revista Instituto Adolfo Lutz* 69, 208-13.

- Carvalho, J.D.G., Viotto, W.H., Kuaye, A.Y. (2007). The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control* 18, 262-267.
- Catão, R.M.R., Ovruski De Ceballos, B.S. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). *Ciência Tecnologia Alimentos* 21, 281-287.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2012). Case Definitions: Nationally Notifiable Conditions Infectious and Non-Infectious Case. (2012). Atlanta, GA: disponível em: [http://wwwn.cdc.gov/nndss/document/2012\\_Case%20Definitions.pdf](http://wwwn.cdc.gov/nndss/document/2012_Case%20Definitions.pdf). Acesso em: 30/03/2013.
- Cenci-Goga, B. T.; Karama, M.; Rossitto, P. V.; Morgante, R. A.; Cullor, J. S. (2003). Research note enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *Journal of Food Protection* 66, 1693-1696.
- Chioda, T.P., Schocken-Iturrino, R.P., Garcia, G.R., Pigatto, C.P., Ribeiro, C.A.M., Rogazzoni, A.V.F. (2007). Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência Rural* 37, 583-585.
- Christison, C. A., Lindsay, D., Von Holy, A. (2008). Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa. *Food Control* 19, 727-733.
- Cordier, J.L. (2009). Microbiological criteria – purpose and limitations. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 95, 28-31.
- Cremonesi, P., Peres, G. Pisoni, G., Moroni, P., Morandi, S., Luzzana, M., Brasca, M., Castiglioni, B. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Letters in Applied Microbiology*, ISSN 0266-8254.
- Crépet, A., Albert, I., Dervin, C., Carlin, F. (2007). Estimation of microbial contamination of food from prevalence and concentration data: application to *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 250-258.
- Crockett, C.S., Haas, C.N., Fazil, A., Rose, J.B., Gerba, C.P. (1996). Prevalence of shigellosis in the U.S. Consistency with dose-Response Information. *International Journal of Food Microbiology* 30, 87-99.

- De Buyser, M. L., Dufour, B., Maire, M., & Lafarge, V. (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology* 67, 1-17.
- Dias, R.S, Soares, A.C.C., Pinheiro,C.S., Faúla, L. (2008). Detecção de enterotoxinas estafilocócicas e de linhagens enterotoxigênicas em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar. *Revista da Fundação Ezequiel Dias* 3, 37-44.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology* 13, 16-34.
- Duarte, M. L. R., Albuquerque, F. C. (2005). Sistema de Produção da Pimenteira-do-reino Embrapa Amazônia Oriental. *Sistemas de Produção*, 1. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/colheita.htm>. Acesso em: 30/05/2012.
- EFSA (European Food Safety Authority). (ECDC) (European Centre for Disease Prevention and Control). (2011). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009; *EFSA Journal*. Disponível em: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal). Acesso em: 30/05/2013.
- EPA (Environmental Protection Agency). (2012). Microbial Risk Assessment. Disponível em: <http://www.epa.gov/hpv/pubs/general/sarfin11.htm>. Acesso em: 30/05/2012.
- Evenson, M.L., Hinds, M.W., Bernstein, R.S., Bergdoll, M.S. (1988). Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology* 7, 311-316.
- FAO/WHO (Food And Agriculture, Organization of The United Nations/Word Health Organization). (2006). *Food safety risk analysis:A guide for national food safety authorities*, ISBN 978-92-5-105-604-2, 98p.
- FAO/WHO (Food And Agriculture, Organization Of The United Nations/Word Health Organization). (2008). *Exposure assessment of microbiological hazards in foods: guidelines*. Microbiological Risk Assessment Series n.7, Roma, 92p.

- Farber, J. M., Ross, W. H., Harwig, J. (1996). Health Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *International Journal of Food Microbiology* 30, 145-154.
- FDA (Food and Drug Administration) (2012). Bad bug book. Handbook of Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. Food and Drug Administration, 2<sup>ed</sup>. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/UCM297627.pdf>. Acesso em: 30/05/2012.
- Ferguson, J.D., Azzaro, G., Gambina, M., Licitra. (2007). Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. *American Dairy Science Association* 90, 5798-5813.
- Ferreira, R.M., Spini, F. De Castro, Carrazza, M., Sant'Ana, D.S., Oliveira, M.T., Alves, L.R.A., Carrazza, T.G. (2011). Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo tipo Minas frescal artesanal. *PUBVET Londrina*, 5, 152ed, artigo 1021.
- Figueiredo, A.V.A, Miranda, M.S. (2011). Análise de Risco aplicada aos alimentos no Brasil: perspectivas e desafios. *Ciência & Saúde Coletiva* 16, 2251-2262.
- Fraser, J.D., Proft, T., (2008). The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunological Reviews* 225, 226–243.
- Fujikawa, H., Morozumi, S. (2006). Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiology* 23, 260-267.
- Genigeorgis, C. (1989). Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *International Journal of food Microbiology* 9, 327-360.
- Gieraltowski, L., Julian, E., Pringle, J., Macdonald, K., Quilliam, D., Marsden-Haug, N., Saathoff-Huber, L., von Stein, D., Kissler, B., Parish, M., Elder, D., Howard-King, V., Besser, J., Sodha, S., Loharikar, A., Dalton, S., Williams, I., Barton, B. C. (2012). Nationwide outbreak of *Salmonella* Montevideo infections associated with contaminated imported black and red pepper: warehouse membership cards provide critical clues to identify the source. *Epidemiology Infection* 30, 1-9.
- Gormley, F. J., Little, C.L., Rawal, N., Gillespie, I.A., Lebaigue, S., Adak, G. K. (2011). A 17 year review of foodborne outbreaks: describing the continuing decline in England and Wales (1992-2008). *Epidemiology Infection* 139, 688-699.

- Gorris, L. (2004). Performance objectives and performance criteria – two sides of the food chain. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 9, 21-27.
- Günaydin, B., Aslantas, O., Demir, C. (2011). Detection of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains from subclinical bovine mastites. *Tropical Animal Health Production* 43, 1633-1637.
- Haas, C. N. (1983). Estimation of Risk Due to Low Doses of Microorganisms: A Comparison of Alternative Methodologies. *American Journal Epidemiology* 118, 573-582.
- Haas, C. N., Rose, J. B. Gerba, C. P., Regli, S. (1993). Risk Assessment of Virus in Drinking Water. *Risk Analysis* 13, 545–552.
- Haas, C. N. Crockett, C. S. Rose J. B., Gerba, C. P., Fazil, A. M. (1996). Assessing the Risk Posed by Oocysts in Drinking Water. *Journal American Water Works Association* 88, 131-136.
- Heidinger, J.C. Winter, C.K, Cullor, J.S. (2009). Quantitative Microbial Risk Assessment for *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus Enterotoxin A* in Raw Milk. *Journal of Food Protection* 72, 1641-1653.
- Hennekinne, J.-A., De Buyser, M.L., Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Review* 36, 815-636.
- Holcomb, D. L.; Smith, M. A.; Ware, G. O.; Hung, Y-C.; Brackett, R. E.; Doyle, M. P. (1999). Comparisons of six dose-response models for use with foodborne pathogens. *Risk Analysis* 19, 1091-1100.
- Holmberg, S. D., and P. A. Blake. 1984. Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. *JAMA* 251, 487-489.
- Hugas, M., Tsigarida, E., Robinson, T. Calistri, P. (2007). Risk assessment of biological hazards in the European Union. *International Journal of Food Microbiology*.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2011). Pesquisa de Orçamentos Familiares. Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_analise\\_consumo/default.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/default.shtm). Acesso em: 10/03/2013.

- ICMSF, (2006). Guia simplificado para a compreensão e uso dos objetivos de inocuidade de alimentos e objetivos de desempenho. Disponível em: <http://www.icmsf.org/pdf/FSO%20Objectives/GuiaSimplificadoPO.pdf>. Acesso em: 10/03/2012.
- Ikeda, T., Tanate, N., Yamaguchi, k., Makino, S-i. (2005). Mass Outbreak of Food Poisoning Disease Caused by Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins A and H. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2793-2795.
- ILSI (International Life Sciences Institute/Europe Report Series). (2007). Using microbiological risk assessment (MRA) in food safety management, 3-36, ISBN 90-78637-05-9.
- Jahan, S. (2012). *Epidemiology of Foodborne Illness, Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry*. ISBN: 978-953-307-916-5. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/scientific-health-and-social-aspects-of-the-food-industry/epidemiology-offoodborne-illness>. Acesso em: 30/05/2013.
- Jardim, A.N.O., Caldas, E.D. (2009). Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. *Química Nova* 32, 1898-1909.
- Jeyamkondan, S.; Jayas, D. S.; Holley, R. A. Microbial growth modelling with artificial neural networks. *International Journal of Food Microbiology* 64, 343-454 2001.
- Kamdem, S.S. Guerzoni, M.E., Baranyi, J. Pin, C. (2008). Effect of capric, lauric and  $\alpha$ -linolenic acids on the division time distributions of single cells of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 122-128.
- Kérouanton, A. Hennekinne, J.A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A., De Buyser, M.L. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology* 115, 369-373.
- Kim, H. J.; Griffiths, M. W.; Fazil, A. M.; Lammerding, A. M. (2009). Probabilistic risk model for staphylococcal intoxication from pork-based food dishes prepared in food service establishments in Korea. *Journal of Food Protection* 72, 1897-1908.
- Lamaita, H.C., Cerqueira, M.M.O.P., Carmo, L.S., Santos, D.A., Penna, C.F.A.M., Souza, M.R. (2005). Contagem de *Staphylococcus* spp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. *Arquivo Brasileiro de Medicina e Zootecnia* 57, 702-709.

- Landeiro, C. M. P. A., Almeida, R. C. C., Nascimento, A. T. M., Ferreira, J. S., YANO, T., ALMEIDA, P. F. (2007). Hazards and critical control points in Brazilian seafood dish preparation. *Food Control* 18, 513-520.
- Larkin, E.A., Carman, R.J., Krakauer, T. Stiles, B.G. (2009). *Staphylococcus aureus*: The Toxic Presence of a Pathogen Extraordinaire. *Current Medicinal Chemistry* 16, 4003-4019.
- Lee, S.J., Park, A. (2008). Quantitative risk assessment for korean style menu items: a case study on the exposure assessment of Saengchae, a Korean Radish Salad. *Japan Journal of Food Engineering* 9, 9-20.
- Lima, C.D. Las C., Cerqueira, M.M.O.P., Ferreira, E.G., Faria Jr., C.L.L., Nelson, D.L., Carmo, L.S., Rosa, C.A. (2008). Microbiological, physical–chemical and sensory evaluation of a traditional Brazilian cheese during the ripening process. *World Journal of Microbiology Biotechnology* 24, 2389-2395.
- Lindqvist, R.; Westöö, A. (2000). Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravad salmon and rainbow trout in Sweden. *International Journal of Food Microbiology* 58, 181-196.
- Lindqvist, R., Sylven, S., Vagsholm, I. (2002). Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 78, 155-170.
- Lindqvist, R. (2006). Estimation of *Staphylococcus aureus* growth parameters from turbidity data: characterization of strain variation and comparison of methods. *Applied And Environmental Microbiology* 4862-4870.
- Little, C., Rhoades, J.R., Sagoo, S.K, Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., Grant, K., McLauchlin, J. (2008). Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiology* 25, 304-312.
- Locking, M.E., Pallock, K.G.J., Allison, L.J., Rae, L., Hanson, M.F., Cowden, J.M. (2011). *Escherichia coli* O157 infection and secondary spread, Scotland, 1999-2008. *Emerging Infectious Diseases* 17, 524-527.
- Loguercio, A.P., Aleixo, J.A.G. (2001). Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural Santa Maria* 31, 1063-1067.
- Maina, E.K, Hu, D.L, Tsuji, T., Omoe, K., Nakane, A. (2012). Staphylococcal enterotoxin A has potent superantigenic and emetic activities but not diarrheagenic activity. *International Journal of Medical Microbiology* 302, 88-95.

- Makita, K., Desissa, F., Teklu, A., Zewde, G., Grace, D. (2012). Risk assessment of staphylococcal poisoning due to consumption of informally-marketed milk and home-made yoghurt in Debre Zeit, Ethiopia. *International Journal of Food Microbiology* 153, 135-141.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). (2003). Instrução Normativa nº62 de 26/08/2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>. Acesso em: 10/03/2012.
- Marta, D., Wallin-Carlquist, N., Schelin, J., Borch, E., Radstrom, P. (2011). Extended staphylococcal enterotoxin D expression in ham products. *Food Microbiology* 28, 617-620.
- Membré, J-M, Lambert, R.J.W. (2008). Application of predictive modelling techniques in industry: from food design up to risk assessment. *International Journal of food Microbiology* 128, 10-15.
- McMeekin, T.A. (2007) Predictive microbiology: quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries. *Meat Science* 77, 17-27.
- McMeekin, T.A., Hill, C., Wagner, M., Dahl, A., Ross. (2010). Ecophysiology of food-borne pathogens: Essential knowledge to improve food safety. *International Journal of Food Microbiology* 139, 564-578.
- McMeekin, T.A., Ross, T. (2002). Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of food Microbiology* 78, 133-153.
- Min, K-H, Jung, Y-J, Kwon, K-Y, Kim, J-H, Hwang, I-G, Yoon, K-S. (2013). Effect of temperature on the production of staphylococcal enterotoxin and thermal inactivation kinetics of *Staphylococcus aureus* in selected ready-to-eat (RTE) foods in Korea. *Journal of Food Safety* 33, 17–24.
- Montville, R.; Schaffner, D. (2005). Monte carlo simulation of pathogen behavior during the sprout production process. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 746-753.
- Moraes, P.M., Vicoso, G.N., Yamazi, A.K., Ortolani, M.B.T., Nero, L.A. (2009). Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese

- produced and on retail sale in Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 245-249.
- Moreira, P.L., Lourenção, T.B., Pinto, J.P., Rall, V. L. (2009). Microbiological quality of spices marketed in the city of Botucatu, São Paulo, Brazil. *Journal of Food Protection* 72, 421-4.
- MS (Ministério da Saúde). (2012a). Doença Diarréica aguda. Situação Epidemiológica. Ministério da Saúde. Brasil. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1549](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1549).
- MS (Ministério da Saúde). (2012c). Dados Epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimento do Ministério da Saúde. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_epidemiologicos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos.pdf). Acesso em 10/03/2012.
- Murmann, L., Corbellini, L.G., Collor, A.A. Cardoso, M. (2011). Quantitative risk assessment for human salmonellosis through the consumption of pork sausage in porto alegre, Brazil. *Journal of Food Protection* 74, 553–558.
- Mustafa, M.M., Jain, L.C.S., Agrawal, C. V. Food Poisoning Outbreak in a Military Establishment (2009). *Medical Journal Armed Forces India (MJAFI)* 65, 240-243.
- Nader Filho, A.; Ferreira, L.M.; Amaral, L.A.; Rossi Junior, O.D.; Oliveira, R.P. (2007). Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia* 59, 1316-1318.
- Najjar, Y. M., Basheer, I. A., Hajimeer, M. N. (1997). Computational neural networks for predictive microbiology: I. methodology. *International Journal of Food Microbiology* 34, 27-49.
- Neilson, S. (2011). k-Means cluster analysis in microsoft excel. Disponível em: <http://www.neilson.co.za/?p=9>. Acesso em: 10/09/2012.
- Nema, V., Agrawal, R., Kamboj, D.V., Goel, A.K. (2007). Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinente. *International Journal of Food Microbiology* 117, 29-35.

- Nero, L.A, Viçosa, G.N., Pereira, F.E.V. (2009). Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 29, 386-390.
- Nero, L.A., Mattos, M.R., Ortolani, M.B.T. (2008). *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. *Zoonoses Public Health* 55, 299–305.
- Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Di Giannatale, E., Salinetti, A.P., Salandra, G., La, Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaglia, N.C., Celano, G.V. (2005). Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 98, 73-79.
- Notermans, S., Boot, R., Tatini, S.,R. (1987). Selection of monoclonal antibodies for detection of staphylococcal enterotoxins in heat processed foods. *International Journal of Food Microbiology* 5, 49-55.
- Nunes, M.M., Mota, A.L.A.A., Caldas, E.D. Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the federal District, Brazil. (2013). *Food Control* 34, 235-240.
- Oliveira, A.B.A., De Paula, C.M.D., Capalonga, R. (2010). Foodborne diseases, main etiologic agents and general aspects: a review. *Revista HCPA* 30, 279-285.
- Oliveira, M.P.; Souza, V.M.; Bergamini, A.M.M.; De Martinis, E.C.P. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control* 22, 1400-1403.
- OPAS (2008). *Perspectiva sobre a análise de risco na segurança dos alimentos. Curso de sensibilização*, Rio de Janeiro,160p.
- Ortolani, M.B.T., Yamazi, A.K., Moraes, P.M., Vicosa, G.N., Nero, L.A. (2010). microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathogens and Diseases* 7, 175-180.

- Osaili, T.M., Jamais, D.O.A., Obeidat, B.A., Hiba., A.B., Reema, F., Subi, H. T.H.S. (2013). Food safety knowledge among food workers in restaurants in Jordan. *Food Control* 31,145-150.
- Padilha, M.R.F., Fernandes, Z.F., Leal, T.C.A., Leal, N.C., Almeida, A.M.P. (2001). Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34, 167-171.
- Panisello, P.J. Rooney, R., Quantick, P.C, Stanwell-Smith, R. (2000). Application of foodborne disease outbreak data in the development q and maintenance of HACCP systems. *International Journal of Food Microbiology* 59, 221-234.
- Pelicioni, M.C.F., Pereira, I. M.T.B. (2003). A vigilância sanitária de alimentos como instrumento de promoção de saúde: relato de experiência de educação em saúde para o comércio varejista de alimentos e construção de um projeto de parceria. *Higiene Alimentar* 17, 33-37.
- Pereira, M.A., Nunes, M.M., Nuernberg, L., Schulz, D., Batista, C.R.V. (2006) Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 37, 159-163.
- Perry, K.S.P. (2004). Cheese: chemical, biochemical and microbiological aspects. *Journal Brazilian Chemical Society* 27, 293-300.
- Planzer, S.B., Cruz, A.G., Sant’Ana, A.S., Moura, M.R.L., Carvalho, L.M.J. (2009). Food safety knowledge of cheese consumers. *Journal Of Food Science* 74, M29.
- Podkowik, M., Park, J.Y., Seo, K.S., Bystroń, J., Bania, J. (2013). Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* 163, 34-40.
- Pouillot, R., Lubran, M.B. (2011). Predictive microbiology models vs. modelling microbial growth within *Listeria monocytogenes* risk assessment: what parameters matter and why. *Food Microbiology* 28, 720-726.
- Qin, J., Cui, Y., Zhao, X., Rohde, H., Liang, T., Wolters, M., Li, D., Campos, C.B., Christner, M., Song, Y., Yang, R. (2011). Strain identification of the shiga toxin responsible for a food poisoning outbreak *Escherichia coli* O104:H4 in Germany by PCR – Producing *Journal Clinical Microbiology* 49, 3439-3440.

- Raj, H.D., Bergdoll, M.S. (1969). Effect of enterotoxin B on human volunteers. *Journal of Bacteriology* 98, 833-834.
- Reij, M.W., Schothorst, M.V. (2000). Critical notes on microbiological risk assessment of food. *Brazilian Journal of Microbiology* 31, 1-8.
- Rezende-Lago, N.C.M., Rossi Jr, O.D., Vidal-Martins, A.M.C., Amaral, L.A. (2007). Occurrence of *Bacillus cereus* in whole milk and enterotoxigenic potential of the isolated strains. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 59, 1563-1569.
- Ribeiro, E.P., Simões, L.G., Jurkiewicz, C.H. (2009). Desenvolvimento de queijo tipo Minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 29, 19-23.
- Rocha, J.S., Buriti, F.C.A., Saad, S.M.I. (2006). Condições de processamento e comercialização de queijo-minas-frescal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 58, 263-272.
- Rho, M-J.; Shaffner, D. (2007) Microbial risk assessment of staphylococcal food poisoning in Korean Kimbab. *International Journal of Food Microbiology* 116, 332-338.
- Rocourt, J., BenEmbarek, P. Toyofuku, H., Schlundt, J. (2003). Quantitative risk assessment of listeria monocytogenes in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 35, 263-267.
- Rodrigues, J., Fidelis, H.L.F., Barbosa, B.F.F., Garcia, T.A., Issy, P.N., Armondos, M.P. De O. (2011). Levantamento das características físico-químicas e microbiológicas de queijo tipo Minas frescal e mussarela produzidos no entorno de Goiânia-GO. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde* 9, 30-34.
- Rose, J. B., Haas, C.N., Regli, S. (1991). Risk assessment and control of waterborne giardiasis. *American Journal of Public Health* 81, 709-713.
- Rosengren, A., Fabricius, A., Guss, B., Sylven, S., Lindqvist, R. (2010). Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *International Journal Food Microbiology* 144, 263–269.
- Rosengren, A., Lindblad, M., Lindqvist, R. (2013). The effect of undissociated lactic acid on *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production. *International Journal of Food Microbiology* 162, 159–166.

- Rosenquist, H., Nielsen, N.L., Sommer, H.M., Norrung, B. Christensen, B.B. (2003). Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *International Journal of Food Microbiology* 83, 87-103
- Ross, T.; Rasmussen, S.; Fazil, A.; Paoli, G.; Summer, J. (2009). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meats in Australia. *International Journal of Food Microbiology* 131, 128-137.
- Sabioni, J.G., Hirooka, E.Y., Souza, M.L.R. (1988). Intoxicação alimentar por queijos tipo Minas frescal contaminado com *Staphylococcus aureus*. *Revista Saúde Pública de São Paulo* 22, 458-61.
- Saboya, L.V., Oliveira, A.J., Furtado, M.M., Spadoti, L.M. (1998). Efeitos físico-químicos da adição de leite reconstituído na fabricação de queijo tipo Minas frescal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 18, 368-378.
- Sandel, M.K., McKillip, J.L. (2004). Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. *Food Control* 15, 5-10.
- Sangaletti, N., Porto, E., Brazaca, S.G.C., Yagasaki, C.A., Dalla Dea, R.C., Silva, M.V. (2009). Estudo da vida útil de queijo minas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 29, 262-269.
- Sant'Ana, A.S. (2011). Avaliação quantitativa do risco de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* em vegetais minimamente processados. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 203p.
- Sant'Ana, A.S., Franco, B.D.G.M. (2009). Avaliação quantitativa de risco microbiológico em alimentos: conceitos, sistemática e aplicações. *Brazilian Journal of Food Technology* 12, 266-276.
- Santana, E.H.W., Beloti, V., Oliveira, T.C.R.M., Moraes, L.B., Tamanini, R., Silva, W.P. (2006). Staphylococci: colonies morphological characteristics, coagulase and EEA production collected from cooled raw milk samples. *Ciências Agrárias, Londrina* 27, 639-646.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Disease Journal* 17, 7-15.

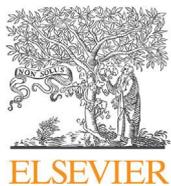
- Schelin, J., Wallin-Carlquist, N., Cohn, M.T., Lindqvist, R., Barker, G.C., Rådström, P. (2011). The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence* 2, 580-592.
- Sergeant, E.S.G. (2009). Epitools epidemiological calculators. Aus Vet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease. Disponível em: <http://epitools.ausvet.com.au>. Acesso em: 10/02/2012.
- Silva, I.M.M., Almeida, R.C., Alves, M.A.O., Almeida, P.F. (2003). Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of minas frescal cheese processing. *International Journal of Food Microbiology* 81, 241-248.
- Silva, M.C.D., Vasconcelos, Silva, J.V.L., Ramos, A.C.S., Melo, R.D., Oliveira, J.O. (2008). Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28, 226-230.
- Silva, R., Cruz, A.G., Faria, J.A.F., Moura, M.M.L., Carvalho, M.J., Water, E.H.M., Sant'Ana, A.S. (2010). Pasteurized milk: efficiency of pasteurization and its microbiological conditions in Brazil. *Foodborne Pathogens and Diseases* 7, 217-219.
- Silva, Z.N., Cunha, A.S., Lins, M.C., Carneiro, L.A.M., Almeida, A.C.F., Queiroz, M.L.P. (2001). Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. *Revista Saúde Pública* 35, 375-379.
- Soejima, T., Nagao, E., Yano, Y., Yamagata, H., Kagi, H., Shinagawa, K. (2007). Risk evaluation for staphylococcal food poisoning in processed milk produced with skim milk powder. *International Journal of Food Microbiology* 115, 29-34.
- Solano, R., Lafuente, S., Sabate, S., Tortajada, C., Olalla, P.G., Hernando, A.V., Caylà, J. (2013). Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus*: An outbreak at a Barcelona sports club in July 2011. *Food Control* 33, 114-118.
- Sospedra, I., Rubert, J., Soriano, J. M., Mañes, J. (2013). Survey of microbial quality of plant-based foods served in restaurants. *Food Control* 30, 418-422.
- Srinivasan, V., Sawanti, A.A., Gillespie, B.E., Headrick, S.J., Ceasaris, L., Oliver, S.P. (2006). Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* Isolated from milk of cows with mastiti. *Foodborne Pathogens And Disease* 3, 274-283.

- Stewart, C.M.; Cole, M.B.; Schaffner, D.W. (2003). Managing the risk of staphylococcal food poisoning from cream-filled baked goods to meet a food safety objective. *Journal of Food Protection* 66, 1310-1325.
- Stringer, M. (2005). Food safety objectives – role in microbiological food safety management. *Food Control* 16, 775-794.
- Swinnem, I.A.M., Bernaerts, K., Dens, E.J.J., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 137-159.
- Tang, Y.W., Stratton, C.W. (2010). *Staphylococcus aureus*: an old pathogen with new weapons. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 30, 179-208.
- Tasci, F., Sahindokuyucu, F., Ozturk, D. (2011). Detection of *Staphylococcus* species and staphylococcal enterotoxins by ELISA in ice cream and cheese consumed in Burdur Province. *African Journal of Agricultural Research* 6, 937-942.
- Tebbutt, G.M. (2007). Does microbiological testing of foods and the food environment have a role in the control of foodborne disease in England and Wales? *Journal of Applied Microbiology* 102, 883-891.
- Tenover, F.C., McAllister, S., Fosheim, G., McDougal, L.,L, Carey, R.B., Limbago, B., Lonsway, D., Patel, J.B., Matthew, J.H., Gorwitz, R. (2008) Individuals in the United States in 2001 to isolates from nasal cultures collected from characterization. *Journal Of Clinical Microbiology* 46, 2837-2841.
- Todd. E.C.D., Greig, J.D., Bartleson, C.A., Michaels, B.S. (2008). Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 4. Infective doses and pathogen carriage. *Journal of Food Protection* 71, 2339-2373.
- Todd. E.C.D., Greig, J.D., Bartleson, C.A., Michaels, B.S. (2009). Outbreaks where food workers have been implicated in the Spread of foodborne disease. Part 6. Transmission and Survival of pathogens in the food processing and preparation environment. *Journal of Food Protection* 72, 202-219.
- Todd, E.C.D. (2011). The international risk governance council framework and its application to *Listeria monocytogenes* in soft cheese made from unpasteurised milk. *Food Control* 22, 1513-1524.
- Tondo, E.C., Guimarães, M.C.M., Henriques, J.A.P., Ayub, M.A.Z. (2000). Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by

- Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. Canadian Journal of Microbiology 46, 1108-1114.
- Tsutsuura, S., Murata, M. (2013). Temperature dependence of staphylococcal enterotoxin A production by *Staphylococcus aureus*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 77, 30-37.
- Udo, E.U., Al-Muft, S., Albert, M.J. (2009). The prevalence of antimicrobial resistance and carriage of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from food handlers in Kuwait city restaurants. Biomed Central Research Notes 2, 1-6.
- Viçosa, G.N., Moraes, P.M., Yamazi, A.K., Nero, L.A. (2010). Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of baird-parker agar, rabbit plasma fibrinogen agar and the petrifilm\_ staph express count system. Food Microbiology 27, 447-452.
- Wang, S-C., Wu, C-M., Xia, S-C., Qi., Y-H., Xia, L-N, Shen, J-Z. (2009). Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China. Veterinary Microbiology 137, 276-281.
- Wattinger, L., Stephan, R., Layer, F., Johler, S. (2012). Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates associated with food intoxication with isolates from human nasal carriers and human infections. European Journal Clinical Microbiology Infections Diseases 31, 455-464.
- Whiting, R.C., Buchanan, R. L. (1997). Development of a quantitative risk assessment model for *Salmonella* Enteritidis in pasteurized liquid eggs. International Journal of Food Microbiology 36, 11-125.
- WHO (World Health Organization). (2008). Foodborne disease outbreaks. Guidelines for investigation and control. ISBN 978-92-4-154722- 2, 162p.
- Yoon, S.K, Ghafoor, K. Kang, Y.S., Sohn, M.G., Hwang, In-G., Kwon, K.S., Park, J. (2011). Exposure assessment of *Staphylococcus aureus* in kimbab, a ready-to-eat Korean food. Food Science Biotechnology 20, 23-28.
- Zafalon, L.F., Arcaro, J.R.P., Filho, A.N., Ferreira, L.M., Veschi, J.L.A. (2009). Toxin gene-carrier *Staphylococcus aureus* isolated from diverse transmission sources during the milking. Revista Adolfo Lutz 68, 269-277.

Zocche, F., Bersot, L.S., Barcellos, V.C., Paranhos, J.K., Rosa, S.T.M., Raymundo, N.K. (2002). Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. *Archives of Veterinary Science* 7, 59-67.

## **ANEXOS**

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

# Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)

## Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, Brazil



Márcia Menezes Nunes<sup>a</sup>, Ana Lourdes Arrais de Alencar Mota<sup>b</sup>, Eloisa Dutra Caldas<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Federal District Health Secretariat, Brasília, DF, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Veterinary Epidemiology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Toxicology, University of Brasília, Campus Darci Ribeiro, 70910-900 Brasília, DF, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 February 2013

Received in revised form

1 April 2013

Accepted 19 April 2013

#### Keywords:

Food

Water

Microbiology

Foodborne disease outbreak

Brazil

### ABSTRACT

This is a retrospective study describing data on the microbiological conditions of food and water obtained from analysis reports issued by the Central Laboratory of the Federal District (LACEN-DF), and information on foodborne disease outbreaks investigated by the Office of Water and Food Borne Diseases of the Federal District (NATHA), Brazil, between 2000 and 2010. A total of 4576 analysis reports were evaluated, from which 92.9% of monitoring samples and 7.1% of samples suspected to be involved in outbreaks. Of the total number of samples, 630 did not comply with Brazilian legislation (rejected). Ready-to-eat food, milk/dairy products, water, spices/seasonings, and ice cream/sorbets had the highest rejection rates among the monitoring samples (18.9–11%), with the first two groups having the highest rates among the outbreak samples (23.5 and 21.7%). *Minas* cheese showed to be the food with the highest rejection rate among the samples analyzed by the LACEN-DF. About 9% of the food samples were rejected due to thermotolerant coliforms and/or coagulase-positive staphylococci, and 10.5% of the water samples were rejected due to *Pseudomonas aeruginosa*. Ready-to-eat food were the main foods involved in the foodborne disease outbreaks investigated by NATHA (51.3% of the 117 outbreaks with the food identified) and *Bacillus cereus* the most identified etiologic agent (41.2% of the 80 outbreaks with the agent identified). This study indicated that microbiological surveillance programs should focus on ready-to-eat food to prevent the occurrence of foodborne disease outbreaks in the region.

© 2013 Published by Elsevier Ltd.

### 1. Introduction

Food and water represent important vehicles for pathogens of substantial public health concern, including those that cause acute diarrheal illnesses, which account for 1.8 million childhood deaths annually, predominantly in developing countries (WHO, 2008). About 4.3 million cases of acute diarrhea were reported in 2010 in Brazil, with almost 4000 deaths (MS, 2012a).

Over 8500 foodborne disease outbreaks were reported by local/state health authorities to the Brazilian Foodborne Disease Outbreak Surveillance System between 2000 and 2010, involving nearly 180,000 individuals and 88 deaths (MS, 2012b). In 2011, the reporting of foodborne disease outbreaks became compulsory in the country, but only for outbreaks occurring on ships or aircraft (Regulation 104/2011, Brazilian Ministry of Health).

In addition to laboratory data on sick individuals and disease reports, microbiological analyses of the suspected food items may contribute to the investigation of outbreaks of foodborne diseases (Oliveira, De Paula, & Capalonga, 2010; WHO, 2008). In Brazil, state laboratories are responsible for conducting analyses of food available for consumption in routine sanitary surveillance programs, and of food suspected of involvement in foodborne disease outbreaks. This information may be used by health authorities and food industry professionals to target prevention efforts against pathogens and foods that cause the outbreaks.

The objective of the present study was to identify the critical biological hazards and the associated foods consumed in the Federal District of Brazil, based on food microbiological analyses and epidemiological data of foodborne disease outbreaks that occurred in the region from 2000 to 2010. Covering a total area of 5,801,937 km<sup>2</sup>, the Federal District is in the Midwestern region of Brazil, where the nation's capital, Brasília, is located. In 2009, the estimated population of the Federal District was about 2.6 million inhabitants.

\* Corresponding author. Tel./fax: +55 61 3107 1871.  
E-mail address: [eloisa@unb.br](mailto:eloisa@unb.br) (E.D. Caldas).

## 2. Material and methods

### 2.1. Microbiological analysis reports

This is a retrospective registry-based descriptive study covering data collected from microbiological analysis reports of samples of food ready for consumption (requiring no further thermal processes before consumption) and water analyzed by the Central Laboratory of the Federal District (LACEN-DF) between 2000 and 2010. The samples were classified by the LACEN-DF as monitoring samples (under its Sanitary Surveillance Program) or as outbreak samples (suspected of involvement in a foodborne disease outbreak). The surveillance program samples were randomly collected (non-statistical sampling) from various commercial establishments, including supermarkets, restaurants, catering services and bakeries. The microbiological analyses of all samples were conducted using standard methodologies (APHA, 2001; MAPA, 2003) and included the following cultural analyses: Mesophilic aerobic count (MAC), coliforms, coliforms at 30 °C, thermotolerant coliforms (TTC), coagulase-positive staphylococci (CPS), *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterococcus* spp. In this study, the food products analyzed by the LACEN-DF were classified into food groups, as shown in Table 1.

The conclusions of the analyses were described in the reports as being either compliant or non-compliant with the microbiological parameters established for food samples by Directive 451/1997 (published by the Brazilian Ministry of Health, in effect until December 2000) and Resolution 12/2001 (published by the National Sanitary Surveillance Agency, ANVISA), and by Resolutions 54/2000 and 275/2005 (ANVISA) for bottled water samples. Samples that were non-compliant with legislation were regarded in this work as rejected samples. In addition to the parameters established by legislation, the results of the outbreak samples analyzed by the LACEN-DF were compared with the infectious dose (ID) of detected pathogenic microorganisms ( $10^5$  CFU/g or mL for *S. aureus* and *B. cereus*) (FDA, 2012). Staphylococcal enterotoxin investigation was conducted in four outbreak samples using the RAPD technique (Random amplified polymorphic DNA), followed by Optimum Sensitivity Plate for strain identification (SEA, SED and TSSH-1).

### 2.2. Foodborne disease outbreak information

Information on foodborne disease outbreaks that took place in the Federal District between 2000 and 2010 were obtained from the Office of Water and Food Borne Diseases (NATHA) of the Epidemiology Department of the Federal District Health Secretariat. Information obtained for each investigated outbreak included the food involved, the etiological agent identified in the food sample and/or the biological sample, number of cases, and age and sex of the individuals affected. Some reports also included the criterion used to conclude the outbreak: laboratory-confirmed, food analysis, laboratory-confirmed/food analysis or clinical-epidemiological, which includes information on symptoms, dietary habits and existence of family members or other consumers with the same symptoms.

### 2.3. Data analysis

Statistical analysis was performed with STATA® V.12. Exact binomial tests were used to identify significant differences in rejection rates among food groups and food items. Odd ratios (OR) were estimated using EpiTools epidemiological calculators (Sergeant, 2009).

## 3. Results

### 3.1. Microbiological analysis

The results of the 4576 analysis reports of food samples ready for consumption and water samples analyzed by LACEN-DF between 2000 and 2010 are described and discussed in this study. Over 90% of the samples analyzed were monitoring samples, and 325 were outbreak samples. The number of monitoring samples analyzed decreased along the period under study, with the lowest number in 2004 (Fig. 1). The number of outbreak samples analyzed varied, reaching a maximum of 56 samples in 2010.

A total of 630 samples (13.8%) were rejected for not meeting the parameters established by Brazilian legislation, of which 564 (13.3% [CI 95%: 12.2–14.2]) were monitoring samples, and 66 (20.3% [CI 95%: 15.9–24.7]) were outbreak samples. Overall, the chance of an outbreak sample being rejected was significantly higher than that of a monitoring sample (OR = 1.6 [CI 95%: 1.3–2.2]). Fig. 2 shows

**Table 1**  
Food groups and food items analyzed by the LACEN-DF.

Food group	Food
Milk and dairy products	Milk (UHT, pasteurized, fermented and powder); cheese (mozzarella, Minas, provolone, Roquefort, parmesan, cottage, brie, coalho); milk cream (fresh and canned); doce de leite; powder for milky beverages; fruit yogurts; butter.
Ready-to-eat food (from catering establishments, restaurants and bars)	Meals containing rice, beans, vegetables, chicken, cattle, lamb, pork, fish and/or seafood; salmon sashimi; baked and fried salgados (with fillings of chicken or cattle meat, ham, cheese and/or shrimp); paste (garlic, tuna, chicken, chickpea, cheddar, ham, salmon, garlic); pasta with various sauces; vegetable salad; potato salad with mayonnaise; potato pure; pamonha; hotdogs; sandwiches; pizza; cakes, puddings.
Water	Mineral water, purified water with salts, ice cubes, bottled water
Spices, seasonings, condiments	Salt based condiments; black pepper (powder/ground and whole peppercorns); dried seasonings (curry, oregano, saffron, curcuma, cinnamon, basil), dried garlic; mayonnaise; mustard; ketchup; refined and brown sugar.
Fruit and vegetables, raw or canned	Canned (sweet corn, olive, pea, carrots, eggplant, summer squash, various fruits); fresh fruits and vegetables; minimally processed vegetables; vegetable oil; margarine.
Non-alcoholic beverages	Soft drinks; frozen fruit pulp; concentrated fruit juice; fruit juice ready for consumption; nectars.
Flour, cereals, cakes, industrialized	Corn starch and flour; wheat flour; oat meal and flour; cereal bran; cereal bars; cereal flakes; cookies, crackers; cakes; cake powder.
Ice cream and sorbets	Ice cream and sorbets of various flavors and fruits
Animal products, processed, and eggs	Canned (sardine, tuna, minced meat in tomato sauce, mocotó); liver paste; sausages; ham (pork, turkey; chicken); mortadella; eggs (quail and chicken); honey.
Snacks and appetizers	Corn snacks of various flavors; potato chips.
Baby food	Infant formula (up to 1 year old)
Chocolates, candies, sweets	Chocolate, candies, confectionary, candies enrobed in chocolate; vegetable and fruit sweet (such as bananada and goiabada)

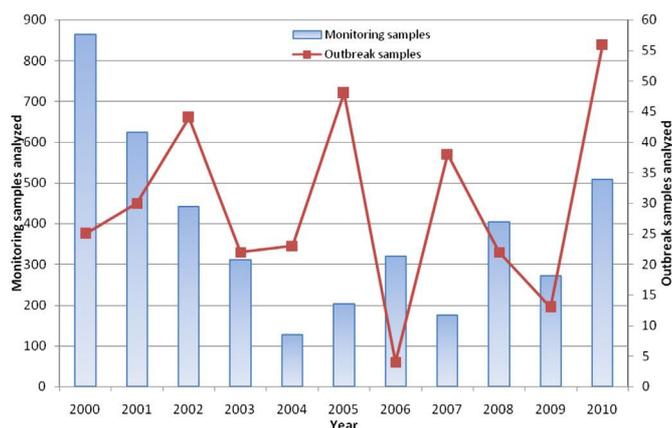


Fig. 1. Number of food ready for consumption and bottled water samples analyzed by the LACEN-DF between 2000 and 2010.

the rejection rates of monitoring and outbreak samples during the period. The highest rejection rate for monitoring samples was registered in 2000 (22.6%), which was also the year with the highest number of samples analyzed (Fig. 1). For the year of 2006, two of the four outbreak samples analyzed (Fig. 1) were rejected.

Monitoring samples from the milk and dairy products group represented 34.7% of all samples analyzed (Table 2). Over 77% of the 325 outbreak samples analyzed were from the ready-to-eat food group. Ready-to-eat food (18.9%), milk/dairy products (16.1%), water (17.4%), spices/seasonings (13.3%) and ice cream/sorbets (11.0%) had the highest percentage of rejection among the monitoring samples, with the first two groups having the highest rejection rate of all outbreak samples (23.5 and 21.7%, respectively) (Table 2).

Within the milk/dairy group, the rejection rate for cheese (439 samples analyzed, including fresh *Minas* cheese, standard *Minas* cheese, mozzarella, cream cheese and cottage cheese) was significantly higher (32.6% [CI 95%: 28.2–37.1]) than for the other foods in the group. Among the milk samples ( $n = 990$ ), pasteurized milk had a significantly higher rejection rate (16.3% [CI 95%: 13.4–19.6]) than UHT (2.2% [CI 95%: 0.8–4.5]) and powdered milk (2.8% [CI 95%: 0.5–7.8]). These frequencies are lower than those found for standard *Minas* cheese (56.9% [CI 95%: 42.2–70.6]) and fresh *Minas* cheese (33.3% [CI 95%: 27–40.1]).

We did not find any significant difference in the rejection rate among the food items from the ready-to-eat food group. However,

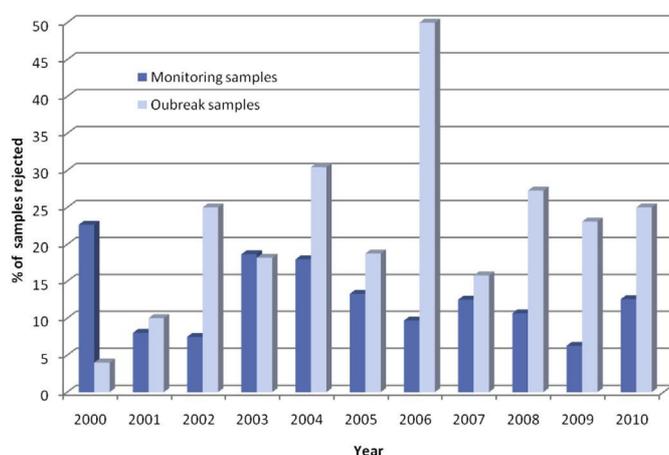


Fig. 2. Percentage of food ready for consumption and bottled water rejected samples according to the Brazilian legislation analyzed by the LACEN-DF from 2000 to 2010.

we did identify that sandwiches ( $n = 115$ ) had the highest rate of rejected samples (40%). All rejected water samples were of mineral water. In the spices/seasonings group, black pepper (ground and whole peppercorns,  $n = 157$ ) had a significantly higher percentage of rejected samples (21.6% [CI 95%: 15.4–28.9]), with a higher chance of being rejected when compared with the other samples of the group (OR = 4.8 [CI 95%: 2.1–10.7]). No samples from the animal products, snacks/appetizers, baby food, and chocolate/candies food groups for the period under study were rejected (Table 2).

Table 3 lists the microorganisms found in the food groups for which at least one sample was rejected for not complying with Brazilian legislation. TTC, *Salmonella* spp and CPS were the parameters most analyzed (74.4, 72 and 38.5% of the total samples collected, respectively). Milk/dairy products, ready-to-eat food, and spices/seasonings groups had the highest % of samples rejected due to TTC (12.0–12.7%). About 9% of the samples analyzed for CPS were rejected (156 samples) for containing counts over the legal limits (500–1000 CFU/g), mainly milk and dairy products (82 samples; 13.8%) (Table 3). About 26–27% of the *Minas* cheese samples were rejected for having TTC and/or CPS counts higher than the legal limits (500 MPN/g and 500 UFC/g, respectively). Almost 60% of the rejected pasteurized milk samples had TTC counts above the legal limits (2 MPN/mL).

Only 0.7% of the samples analyzed for *Salmonella* spp contained this microorganism (all rejected), mainly from the spices/seasonings group (Table 3), mostly black pepper. *B. cereus* was mostly investigated in ready-to-eat food (814 samples), of which 5.8% had microorganism counts above the legal limit (1000 CFU/g) (Table 3), and 40 samples had levels higher than the infectious dose ( $10^5$  CFU/g). Of the 371 samples analyzed for *P. aeruginosa*, 97.6% were bottled water samples, with a 10.5% rejection rate ( $>2.2$  MPN/100 mL; Table 3).

*E. coli* was present in 64 of the 866 samples analyzed for this parameter (7.4%). The detection rate for spices/seasonings (22.6% [CI 95%: 13.8–33.8]) was higher than for milk/dairy products (7.9% [CI 95%: 4.2–13.5]) and fruit/vegetables (6.8% [CI 95%: 1.9–6.4]), but similar to ready-to-eat food (14.9% [CI 95%: 8.2–16.2]). Among the 12 samples of milk/milk products containing *E. coli*, 9 were of fresh *Minas* cheese. Brazilian legislation only establishes parameters for *E. coli* in bottled water (where it should not be present), but there was no positive sample for this microorganism among the bottled water samples analyzed by the LACEN-DF.

The presence of *S. aureus* was investigated in 276 samples (6% of all samples collected, 96% until 2005), with 31 positive samples, of which 25 of ready-to-eat food (80%), 5 of cheese samples and one of mineral water. In 13 samples, *S. aureus* was found at levels higher than  $10^5$  CFU/g and strains isolated from four outbreak samples (all ready-to-eat food from a single outbreak) tested positive for at least one enterotoxin investigated (SEA, SED, and/or TSSH-1).

### 3.2. Foodborne disease outbreaks reported

A total of 195 foodborne disease outbreaks occurring in the Federal District were notified by NATHA between 2000 and 2010, of which 162 were investigated. Over 40% of the investigated outbreaks occurred in 2009 (33) and 2010 (34). During these two years, 69 samples suspected to be involved in outbreaks were analyzed by the LACEN-DF (outbreak samples, Fig. 1).

The food involved was identified in 117 of investigated outbreaks (72.2%), with 126 samples collected (Table 4). Ready-to-eat food (including sandwiches, mayonnaise and meat food) were the incriminated foods in over half of the outbreaks. The etiological agent was identified in 80 outbreaks, 41.2% of which involved *B. cereus*, 26.2% *S. aureus*, and 22.5% *Salmonella* spp. A total of 104 food samples were collected from these 80 outbreaks (Table 4).

**Table 2**  
Samples analyzed by the LACEN-DF between 2000 and 2010, and percentage of rejection according to Brazilian legislation, per food group.

Group	Monitoring samples		Outbreak samples	
	Analyzed, N	Rejected, % (CI 95%)	Analyzed, N	Rejected, % (CI 95%)
Milk and dairy products	1587	16.1 (14.3–18.0)	23	21.7 (7.4–43.7)
Ready-to-eat food	853	18.9 (16.3–21.6)	251	23.5 (18.4–29.2)
Water	385	17.4 (13.7–21.5)	6	0 (0–45.9)
Spices, seasonings, condiments	314	13.3 (9.8–17.6)	0	0
Fruit and vegetables, raw or canned	272	4.0 (1.9–6.9)	4	25.0 (0.6–80.5)
Non-alcoholic beverages	232	2.6 (0.9–5.5)	5	20.0 (0.5–7.1)
Flour, cereals, cakes, industrialized	207	1.0 (0.1–3.4)	9	0 (0–33.6)
Ice cream and sorbets	181	11.0 (6.8–16.5)	0	0
Animal products, processed, and eggs	138	0 (0–2.6)	22	0 (0–15.4)
Snacks and appetizers	30	0 (0–11.5)	0	0
Baby food	26	0 (0–13.2)	2	0
Chocolates, candies, sweets	26	0 (0–16.1)	3	0 (0–7)
<b>Total</b>	<b>4251</b>	<b>13.3 (12.2–14.2)</b>	<b>325</b>	<b>20.3 (15.9–24.7)</b>

CI = confidence interval confidence interval at 95%.

The investigated outbreaks involved 3904 cases, with an average of 24.1 sick individuals per outbreak; 699 individuals received medical care. The highest number of individuals per outbreak occurred in 2003 (305 individuals in 4 outbreaks), but neither the food involved nor the etiological agent was identified in any of these outbreaks. Most of the individuals involved were between 20 and 49 years of age, but in 2007 they were mostly between the ages of 5 and 9 (31 individuals). The only death registered during the period occurred in 2010 due to an outbreak at a foster home that affected 32 children, 11 of whom were under the age of 4. Rotavirus was the agent involved, but the incriminated food was not identified.

The criterion used to conclude the investigation was included in 101 investigated outbreak reports (62.3%). The criterion was clinical-epidemiological in 67.3% of them, laboratory-confirmed in 17.8%, and based on food analysis alone or including laboratory confirmation in 14.8%.

#### 4. Discussion

The results of this investigation have shown that milk and dairy products was the food group most analyzed by the LACEN-DF, and was also the group with the highest rejection rate. Cheese had the highest frequency of rejection within this group, mainly Minas cheese. Typically Brazilian, Minas cheese is the most consumed cheese in the country (about 30 g/person/day; IBGE, 2011). The fresh type, which can be made with raw milk in artisanal production (Regulation 44864/2008; state of Minas Gerais), has high humidity (maximum of 45.9%), and a maximum shelf life of 9 days under refrigeration. Standard/ripened Minas cheese undergoes

maturation for 20–30 days before marketing, with a shelf life of about 90 days under refrigeration (Perry et al., 2004).

About 13% of the milk and dairy product samples analyzed by the LACEN-DF were rejected due to high TTC counts, mainly Minas cheese samples. Salotti, Carvalho, Amaral, Vidal-Martins, and Cortez (2006) found 75% of the 60 fresh artisanal and industrial Minas cheese samples analyzed in São Paulo to be non-compliant with the legal limits for TTC. TTC is an indicator of the possible presence of pathogens such as *E. coli*, which was detected in 7.9% of the milk/dairy samples analyzed by the LACEN-DF for this parameter, mostly fresh Minas cheese. The presence of *E. coli* has been widely accepted as an indicator of faecal contamination during food handling (Campos, Kipnis, Porfirio, & Borges, 2006). *E. coli* was present in all 55 samples of Minas cheese produced with raw milk in Minas Gerais, and in 70% of the 24 samples of fresh Minas cheese in the state of Goiás (Campos et al., 2006). Rosengren, Fabricius, Guss, Sylven, and Lindqvist (2010) found *E. coli* in 34% of the 55 raw milk cheeses analyzed in Sweden; levels in raw milk fresh cheese were significantly lower when starter cultures were used, indicating that contamination occurred later in the cheese production process.

About 26% of the Minas cheese samples analyzed by the LACEN-DF were rejected for containing CPS counts higher than the legal limits, a lower rate than that found by Moraes, Vicsosa, Yamazi, Ortolani, and Nero (2009; 30.9%) and Brant, Fonseca, and Silva (2007; 92.5%) in samples collected in Minas Gerais. Salotti et al. (2006) found 15% of the 60 samples of fresh Minas cheese containing high CPS counts, with higher rejection rates among artisanal cheese. Among the *Staphylococcus* species capable of producing coagulase, *S. aureus* is the most prevalent in

**Table 3**  
Microorganisms found in samples analyzed by the LACEN-DF for which there was at least one rejected sample.

Group	Number of samples analyzed (% rejection due to the microorganism)							
	TTC	<i>Salmonella</i>	CPS	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Coliforms	MAC	Coliforms at 30°
All groups <sup>a</sup>	3408 (9.3)	3294 (0.7)	1763 (8.9)	1423 (3.6)	371 (10.5)	885 (10.4)	590 (3.0)	133 (20.3)
Milk and dairy	1137 (12.7)	1011 (0.5)	592 (13.8)	276 (1.4)	2 (50.0)	409 (14.4)	508 (2.9)	108 (25.0)
Ready-to-eat	935 (12.7)	132 (0.7)	772 (8.9)	814 (5.8)	6 (0)	24 (4.2)	8 (0)	19 (0)
Water	360 (1.4)	32 (3.1)	4 (25)	22 (0)	362 (10.5)	363 (5.2)	2 (0)	0 –
Spices/seasonings	257 (12.0)	257 (6.6)	4 (0)	47 (0)	1 (100)	1 (0)	2 (0)	0 –
Fruit & veg., raw, canned	186 (6.4)	185 (0)	66 (0)	50 (0)	0 –	2 (0)	9 (0)	1 (0)
Non-alcoholic beverages	145 (0.7)	132 (0)	17 (0)	55 (1.8)	0 –	27 (0)	17 (0)	0 –
Flour, cereals, cakes	197 (0.5)	179 (0)	103 (0.9)	77 (0)	0 –	9 (11.1)	8 (0)	3 (0)
Ice cream/sorbet	70 (4.2)	176 (0)	130 (3.8)	16 (0)	0 –	27 (44.4)	28 (10.7)	0 –

TTC = thermotolerant coliforms; CPS = Coagulase-positive staphylococci; MAC = mesophilic aerobic count.

<sup>a</sup> includes food groups for which none of the samples was rejected.

**Table 4**

Food and etiologic agents identified in the foodborne disease outbreaks occurring in the Federal District from 2000 to 2010 and investigated by NATHA.

Food	NF <sub>1</sub>	% <sup>a</sup>	Agent	NF <sub>2</sub>	% <sup>b</sup>
Outbreaks with food identified = 117			Outbreaks with agent identified = 80		
Ready-to-eat food	60	51.3	<i>B. cereus</i>	33	41.2
Bakery products	14	12.0	<i>S. aureus</i>	21	26.2
Water	11	9.4	<i>Salmonella</i> spp	18	22.5
Cheese	7	6.0	<i>C. perfringens</i>	15	18.8
Croquets/savory	7	6.0	<i>E. coli</i>	5	6.2
Fruits/nuts	7	6.0	<i>V. parahaemolyticus</i>	3	3.8
Eggs/egg products	7	6.0	Others	9	11.2
Others	12	11.1	<b>Total of samples</b>	<b>104</b>	
<b>Total of samples</b>	<b>126</b>				

NF<sub>1</sub> = number of food samples collected during the outbreaks with the food identified.

NF<sub>2</sub> = number of food samples collected during the outbreaks with the agent identified.

<sup>a</sup> Relative to 117 outbreaks with the food identified.

<sup>b</sup> Relative to 80 outbreaks with the agent identified.

staphylococcal food intoxication outbreaks worldwide, causing nausea, stomach cramps, vomiting, and diarrhea (FDA, 2012; Hennekinne, de Buyser, & Dragacci, 2012). Cow mastitis, mainly caused by *S. aureus*, is considered one of the main problems in dairy cattle infections, and may affect the sanitary conditions of the produced milk (Zafalon, Arcaro, Filho, Ferreira, & Veschi, 2009). *S. aureus* was only found in cheese samples among the 25 milk/dairy samples analyzed for this parameter by the LACEN-DF.

*Salmonella* spp and *E. coli* were mostly found in samples from the spices/seasonings group, mainly black pepper. Moreira, Lourenço, Pinto, and Rall (2009) found 5.6% of the 233 spice samples collected in the state of São Paulo containing *Salmonella*, similar to what was found in the Federal District. The authors also found black pepper (and cumin), to have the lowest microbiological quality among the spices. In Brazil, contamination of black pepper with *Salmonella* spp and other enterobacteria occurs mainly due to the lack of good manufacturing practices, mostly during the drying process, which may occur on the floor in an open area to which domestic animals have free access (Duarte & Albuquerque, 2005). A *Salmonella* outbreak associated with salami products made with imported contaminated black and red pepper was recently reported in the USA (Gieraltowski et al., 2012).

About 20% of the ready-to-eat food samples analyzed by the LACEN-DF were rejected, a rate similar to what was found by Cardoso et al. (2010) in ready-to-eat food samples collected at 83 public schools in the state of Bahia (20.4%). The authors also found 2.4% of the samples containing *E. coli*, a much lower frequency than that found in the Federal District (14.9% of the ready-to-eat food samples analyzed for this parameter). High contamination of ready-to-eat food is a worldwide issue and is most likely caused by inadequate cleaning practices or hygienic handling (Christison, Lindsay, & von Holy, 2008; Sospedra, Rubert, Soriano, & Mañes, 2013).

Data obtained from NATHA showed that ready-to-eat food was the food group most involved in the outbreaks investigated in the Federal District, confirming other studies that show that foods that are handled during preparation and are not heated prior to consumption present the greatest risk (Tebbutt, 2007). The etiological agents identified in the outbreaks investigated by the NATHA included *B. cereus*, *S. aureus*, and *Salmonella* spp., which were also the most prevalent agents found in the outbreak samples analyzed by the LACEN-DF (data not shown).

The clinical-epidemiological criterion was used to conclude almost 70% of the outbreaks investigated by NATHA, a result that

was expected as most of the notifications came from the hospitals where the patients were under care. In Brazil, when the food involved in an outbreak is identified by the affected individuals, the food is normally discarded to avoid additional exposure. Hence, very rarely is the food available for analysis. Indeed, food analysis information was used to conclude only 14.8% of the investigations, similar to what was found for the 3737 outbreaks reported nationwide from 1999 to 2004 (15.5%; do Carmo et al., 2005).

In a review to investigate the contribution of microbiological analysis to food safety in England and Wales, Tebbutt (2007) pointed out that, although food microbiological analysis was important during outbreak investigation, routine testing by local authorities is often of limited use and could be improved by more targeted surveillance. In the Federal District, ready-to-eat food, the food group most involved in the outbreaks investigated by NATHA, was the second most analyzed food group under the LACEN-DF surveillance program. However, we found that the results of the outbreak sample analysis conducted by the LACEN-DF were of limited use for the investigation of the outbreaks. Although 126 food items were identified as being involved in the outbreaks investigated by NATHA, only in 15 of the outbreaks did the food analyzed contribute to the conclusion of the investigation. On the other hand, 44 outbreak samples analyzed by the LACEN-DF had either *B. cereus* or *S. aureus* above the infectious dose or tested positive for *E. coli* or *Salmonella* spp. However, these results were not reflected in the outbreak investigations conducted by NATHA.

The increase in the number of foodborne disease outbreaks reported and investigated in the Federal District in 2009 and 2010 indicates a significant improvement in local epidemiological surveillance efforts. However, about one-third of the investigated outbreaks did not have the food involved identified, over half did not have the agent identified, and almost 40% did not have the conclusion criterion reported. Lack of the etiologic agent is mainly due to late notification and sampling, the use of antibiotics by the affected population, and the limited number of routine analyses conducted by the laboratories, including the identification of the enterotoxigenic strains (do Carmo et al., 2005). Only four outbreak samples analyzed by the LACEN-DF during the period under study were tested for staphylococcal enterotoxins.

At the national level, over 8500 outbreaks were reported by the local sanitary authorities to the national epidemiological surveillance system from 2000 to 2011, with 88 deaths (MS, 2012b). The main vehicles involved were mixed foods (~1500 outbreaks) and eggs and egg products (~900 outbreaks); milk and dairy products were involved in over 300 outbreaks. *Salmonella* spp was the main etiologic agent identified (~1700 outbreaks), followed by *S. aureus* (~800 outbreaks; MS, 2012b). This profile is different from what was found in the Federal District, where *B. cereus* was the main agent identified in the investigated outbreaks.

The number of food disease outbreaks reported in Brazil is most likely underestimated. According to do Carmo et al. (2005), over 3 million hospitalizations due to foodborne diseases (ICD 10 A00 to A09) occurred in the country from 1999 to 2004, and 25,281 fatalities from 1999 to 2002. Most of the outbreaks involved in these cases were probably never investigated or reported. Additionally, the reporting of foodborne disease outbreaks only became compulsory in the country in 2011, being restricted to outbreaks occurring on ships or aircraft (Regulation 104/2011, Brazilian Ministry of Health).

The results of this study indicate that the LACEN-DF should prioritize the analysis of ready-to-eat food under its microbiological surveillance programs, due to their frequent involvement in foodborne disease outbreaks. Efforts should be made to improve the outbreak notification and investigation system and the laboratory capabilities in the Federal District so that biological and food

samples may be collected in a timely and correct manner so as to identify the etiological agent. Additionally, it is essential that CPS positive samples be tested for *S. aureus* and the toxigenic potential of the isolated strains determined so that the vehicle involved in the outbreaks are identified. This is the first study reporting governmental microbiological data on food and water in Brazil that relates food analyses to outbreak reporting. Comparison with other scenarios in the country is therefore not possible.

This study highlighted the inadequate hygienic-sanitary conditions of the Minas cheese available for consumption in the Federal District and other Brazilian regions, and the importance of implementing control measures and good manufacturing practices during the handling and storage of this product.

### Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the Public Health Laboratory (LACEN-DF) for providing the food analysis reports and the Office of Water and Foodborne Diseases (NATHA) for providing outbreak information. We thank Ravane Gracy Ament Marcheti for helping with the data collection and Prof. Marcia Aguiar Ferreira for providing many thoughtful suggestions.

### References

- APHA. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington, DC, USA: American Public Health Association (APHA).
- Brant, L. M. F., Fonseca, L. M., & Silva, M. C. C. (2007). Microbiological quality of artisanal Minas cheese, manufactured in the region of Serro-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59, 1570–1574.
- Campos, M. R. H., Kipnis, A., Porfírio, M. C. D., & Borges, A. (2006). Phenotypic characterization by antibiogram of *Escherichia coli* strains isolated from handlers, raw milk and “minas Frescal” cheese samples in a dairy process plant in Goiás, Brazil. *Ciênc Rural*, 36, 1221–1227.
- Cardoso, R. C. V., Almeida, R. C. C., Guimarães, A. G., Goes, J. A. W. G., Santana, A. A. C., Silva, S. A., et al. (2010). Microbial quality assessment of ready-to-eat foods served at schools supported by the National Scholar Food Supply Program. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 69, 208–213.
- Christison, C. A., Lindsay, D., & von Holy, A. (2008). Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa. *Food Control*, 19, 727–733.
- do Carmo, G. M. I. C., Oliveira, A. G., Domech, C. P., Santos, D. A., Almeida, M. G., Berto, L. H., et al. (2005). Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999–2004. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. *Boletim Epidemiológico*, 6, 1–7.
- Duarte, M. L. R., & Albuquerque, F. C. (2005). Sistema de Produção da Pimenteira-do-reino Embrapa Amazônia Oriental. *Sistemas de Produção*, 1. Available at <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/colheita.htm>. Accessed 05.10.13.
- FDA (Food and Drug Administration). (2012). *Bad bug book. Handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins* (2nd ed.). Food and Drug Administration. Available at <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>.
- Gieraltowski, L., Julian, E., Pringle, J., Macdonald, K., Quilliam, D., Marsden-Haug, N., et al. (2012). Nationwide outbreak of *Salmonella* Montevideo infections associated with contaminated imported black and red pepper: warehouse membership cards provide critical clues to identify the source. *Epidemiology and Infection*, 30, 1–9.
- Hennekinne, J.-A., de Buyser, M.-L., & Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 815–836.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2011). *Pesquisa de Orçamentos Familiares. Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil*. Available at [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoadevida/pof/2008\\_2009\\_analise\\_consumo/default.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoadevida/pof/2008_2009_analise_consumo/default.shtm). Accessed 05.10.13.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). (2003). *Instrução Normativa nº 62 de 26/08/2003*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Available at <http://www.defesaagropecuaria.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=665>. Accessed 05.10.13.
- Moraes, P. M., Vicosa, G. N., Yamazi, A. K., Ortolani, M. B. T., & Nero, L. A. (2009). Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 245–249.
- Moreira, P. L., Lourenção, T. B., Pinto, J. P., & Rall, V. L. (2009). Microbiological quality of spices marketed in the city of Botucatu, São Paulo, Brazil. *Journal of Food Protection*, 72, 421–424.
- MS (Ministério da Saúde). (2012a). *Doença Diarréica aguda. Situação Epidemiológica*. Brasil: Ministério da Saúde. Available at [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1549](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1549). Accessed 05.10.13.
- MS. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2012b). *Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2011*. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos do Ministério da Saúde. Available at [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_epidemiologicos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos.pdf). Accessed 05.10.13.
- Oliveira, A. B. A., De Paula, C. M. D., & Capalonga, R. (2010). Foodborne diseases, main etiologic agents and general aspects: a review. *Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, 30, 279–285.
- Perry, K. S. P. (2004). Cheese: chemical, biochemical and microbiological aspects. *J Braz Chem Soc*, 27, 293–300.
- Rosengren, A., Fabricius, A., Guss, B., Sylven, S., & Lindqvist, R. (2010). Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 263–269.
- Salotti, B. M., Carvalho, A. C. F. B., Amaral, L. A., Vidal-Martins, A. M. C., & Cortez, A. L. (2006). Microbial quality of marketable “minas frescal” cheese in Jaboticabal, SP, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 73, 171–175.
- Sergeant, E. S. G. (2009). *Epitools epidemiological calculators*. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease. Available at <http://epitools.ausvet.com.au>. Accessed 05.10.13.
- Sospedra, I., Rubert, J., Soriano, J. M., & Mañes, J. (2013). Survey of microbial quality of plant-based foods served in restaurants. *Food Control*, 30, 418–422.
- Tebbutt, G. M. (2007). Does microbiological testing of foods and the food environment have a role in the control of foodborne disease in England and Wales? *Journal of Applied Microbiology*, 102, 883–891.
- WHO (World Health Organization). (2008). *Foodborne disease outbreaks. Guidelines for investigation and control* (pp. 1–162). World Health Organization.
- Zafalon, L. F., Arcaro, J. R. P., Filho, A. N., Ferreira, L. M., & Veschi, J. L. A. (2009). Toxin gene-carrier *Staphylococcus aureus* isolated from diverse transmission sources during the milking. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 68, 269–277.

**Anexo II: Dados reportados pelos LACENs referentes às análises de queijo minas frescal(N=338)**

UF	Data da coleta	Fabricação	Vencimento	T(°)	Peso (g)	Umidade %	%NaCl*	CTT**(NMP/g)	SCP (UFC/g)***
DF	04/09/2000	24/08/2000	24/09/2000	8	600	55,00		0	0
DF	11/09/2000	22/08/2000	22/09/2000	9	500	55,00		2400	0
DF	21/03/2000				410	55,00		0	30000
DF	21/03/2000			7	670	55,00		0	30000
DF	12/06/2000	10/06/2000	30/06/2000	4	506	46,88		230	0
DF	30/05/2000	30/05/2001	30/06/2001	5	506	50,76		2400	0
DF	29/05/2001	18/05/2001	18/07/2001	8	600	55,00		93	0
DF	11/03/2002			12	506	55,00		110	0
DF	20/12/2002			15	506	55,00		24000	0
DF	07/12/2002			15	506	55,00		0	0
DF	07/12/2002			15	506	55,00		0	0
DF	13/10/2004			Ambiente	506	45,42		4600	1300000
DF	19/01/2005			11,5	506	55,00		0	33000000
DF	28/08/2006	24/08/2006	12/09/2006	7,5	500	57,80		0	0
DF	28/08/2006	09/08/2006	06/09/2006	7,5	568	57,00		0	0
DF	28/06/2006	01/09/2006	02/12/2006	7	546	71,26		24000	0
DF	25/09/2006	04/09/2006	18/10/2006	10	370	69,27		0	0
DF	04/09/2006	24/07/2006		5	500	47,30		0	0
DF	09/10/2006	07/09/2006	21/10/2006	5	400	55,00		460	0
DF	04/09/2006	16/08/2006	16/10/2006	5	496	56,59		0	0
DF	24/01/2006			8	366	55,00		0	0
DF	01/12/2008	11/11/2008	25/12/2008	8	400	34,71		0	0
DF	01/12/2008	26/11/2008	25/12/2008	8	400	46,39		0	0
DF	25/03/2008	23/02/2008	13/04/2008	6	250	49,00		0	0
DF	29/04/2008	05/03/2008	19/05/2008	5	560	53,04		0	0
DF	31/03/2008	05/03/2008	19/05/2008	10	556	42,65		0	0

UF	Data da coleta	Fabricação	Vencimento	T(°)	Peso (g)	Umidade %	%NaCl*	CTT**(NMP/g)	SCP (UFC/g)***
DF	25/09/2001			-10	506	55,00		0	0
DF	02/10/2001	02/10/2001	02/11/2001	5	506	55,00			0
DF	11/09/2001	10/09/2001	30/09/2001	5	506	48,64		2000	0
DF	11/09/2001	10/09/2001	30/09/2001	5	506	52,62		23	0
DF	13/11/2001			7	506	49,94		2400	0
DF	13/11/2001				506	49,94		4600	150000
DF	10/11/2001			-2	506	55,00		0	0
DF	07/12/2001			15	506	55,00		0	0
DF	07/12/2001			15	506	55,00		40	0
DF	21/11/2001				506	53,55		90	0
DF	23/10/2001	23/10/2001	11/11/2001	5	506	54,90		0	0
DF	25/02/2000	22/02/2000	09/03/2000	10	506	55,00			0
DF	15/02/2000			26	200	55,00			22000
DF	17/02/2000				506	55,00			0
DF	18/02/2000	14/02/2000	24/02/2000		160	55,00			0
DF	15/02/2000				200	55,00		1100	9000
DF	14/02/2000			6	500	55,00		2400	0
DF	14/02/2000			2	500	55,00		2400	1500
DF	14/02/2000			6	500	55,00		2400	20000
DF	24/02/2000	22/02/2000	12/03/2000	9	466	55,00		0	0
DF	25/02/2000			10	500	55,00		9	0
DF	25/02/2000			10	400	55,00		9	30000
DF	13/03/2000			10	400	55,00		2400	30000
DF	28/06/2000				506	53,34		93	0
DF	21/06/2000	20/06/2000	10/07/2000	4	506	53,18		0	0
DF	11/12/2000	10/12/2000	10/01/2001	5	506	53,37		240	0
DF	06/12/2000				506	55,00		240	0
DF	10/07/2000	09/07/2000	09/08/2000	4	506	54,90		0	0

UF	Data da coleta	Fabricação	Vencimento	T(°)	Peso (g)	Umidade %	%NaCl*	CTT**(NMP/g)	SCP (UFC/g)***
DF	10/07/2000	09/07/2000	09/08/2000	4	506	55,00		0,4	0
DF	03/06/2002	29/05/2012	18/06/2012	1,5	500	46,94		0	0
DF	11/06/2002	24/05/2002	23/06/2002	4,5	500	54,90		240	120000
DF	06/02/2006			15	506	55,00		0	3000000
DF	30/01/2002			22	506	55,00		0	0
DF	13/08/2002			-13	506	55,00		0	0
DF	16/09/2003		02/10/2003	10	500	53,69		240	11000
DF	16/09/2003	16/08/2003	30/09/2003	8	250	47,77		0	0
DF	16/09/2003	29/07/2003		8	250	43,41		0	0
DF	16/09/2003	02/09/2003	02/11/2003	10	506	54,90		110	0
DF	16/09/2003	10/09/2003	24/09/2003	9	500	51,76		24000	50000
DF	02/09/2003	13/08/2003	13/10/2003	8	500	46,72		24000	0
DF	02/09/2003	30/08/2003	30/09/2003	10	500	46,38		930	10000
DF	19/08/2003	13/08/2003	13/10/2003	8	520	54,90		0	0
DF	19/08/2003	11/07/2003	11/12/2003	8	253	55,00		0	0
DF	04/08/2003	18/07/2003	18/08/2003	7	624	54,90		0	0
DF	22/07/2003	21/07/2003	25/07/2003	17	502	46,00		0	0
DF	28/10/2003	21/10/2003	21/11/2003	9	399	50,76		0	0
DF	28/10/2003	10/10/2003	12/11/2003	6,5	500	52,00		0	0
DF	28/10/2003	22/10/2003	22/12/2003	3	600	48,76		24000	120000
DF	06/11/2003	15/10/2003	06/11/2003	7	400	54,64		20000	12000
DF	24/11/2003	09/11/2003	30/11/2003	6	400	52,96		0	0
DF	24/11/2003	17/11/2003	06/12/2003	6	400	54,90		230	0
DF	04/02/2003	11/01/2003	11/03/2003	10	506	55,00		230	100000
DF	04/02/2003			10	506	55,00		11000	540000
DF	28/01/2003			-10	506	55,00		9	42000
DF	28/01/2003			-10	506	55,00		2400	30000
DF	28/01/2003			-12	506	55,00		4	0

UF	Data da coleta	Fabricação	Vencimento	T(°)	Peso (g)	Umidade %	%NaCl*	CTT**(NMP/g)	SCP (UFC/g)***
DF	07/07/2003	09/06/2003	09/11/2003	11,5	506	47,19		0	0
DF	07/07/2003	07/07/2003	11/07/2003	7	546	51,46		24000	120000
DF	07/07/2003	15/06/2003	30/07/2003	7	250	42,96		0	0
DF	07/07/2003	26/06/2003	29/07/2003	0	500	53,00		0	0
DF	24/06/2003	12/06/2003	12/08/2003	7	576	53,04		24000	0
DF	23/06/2003	18/06/2003	07/07/2003	10	500	54,50		4600	60000
DF	23/06/2003	17/06/2003	07/07/2003	10	516	54,00		0	0
DF	16/03/2004	03/03/2004	03/05/2004	8	500	64,18		0	2400
DF	23/03/2004	17/03/2004	05/04/2004	6	506	45,96		4600	0
DF	23/03/2004	08/03/2004	21/04/2004	6	500	46,90		0	0
DF	23/04/2004	19/03/2004	19/04/2004	6	506	48,95		0	61000
DF	23/04/2004	09/03/2004	09/05/2004	6	500	46,31		0	30000
DF	28/09/2004	10/09/2004	10/10/2004	8	250	54,56		0	0
DF	14/09/2004	02/09/2004	02/10/2004	8	512	49,62		2400	0
DF	14/09/2004	01/09/2004	01/11/2004	9	516	51,92		2100	0
DF	28/09/2004	06/09/2004	06/11/2004	15	520	40,59		930	0
DF	31/08/2004	26/08/2002	26/09/2004	8	454	54,61		430	0
DF	30/08/2004	07/08/2004	11/09/2004	1	500	48,59		0	0
DF	16/08/2004	05/08/2004	18/09/2004	4	400	55,00		0	0
DF	16/08/2004	09/08/2004	28/08/2004	4	476	48,43		0	0
DF	25/04/2005	01/04/2005	16/07/2005	6	500	50,83		0	100
DF	25/04/2005	16/04/2005	10/05/2005	6	500	52,56		0	90
DF	13/06/2005	01/06/2005	01/08/2005	4	610	55,00		0	0
DF	23/05/2005	10/05/2005	11/06/2005	10	400	54,84		0	0
DF	27/06/2005			Ambiente	506	55,00		230	47000
DF	08/03/2005			Ambiente	506	55,00		0	5
DF	08/03/2005			Ambiente	506	55,00		11000	0
DF	24/01/2006	24/01/2006	25/02/2006	8	366	55,00		24000	300000

UF	Data da coleta	Fabricação	Vencimento	T(°)	Peso (g)	Umidade %	%NaCl*	CTT**(NMP/g)	SCP (UFC/g)***
DF	08/03/2005			8	506	55,00		24000	21000
DF	28/06/2006	01/05/2006	31/05/2006	4,5	500	66,89		0	0
DF	02/05/2006			9	530	45,56		0	0
DF	09/05/2006	23/04/2006	28/05/2006	6,5	500	54,50		0	12000
DF	18/07/2006	10/06/2006	30/07/2006	10	250	50,59		0	0
DF	10/07/2006	24/06/2006	24/08/2006	4	555	46,07		0	0
DF	30/05/2006	12/05/2006	12/07/2006	4	418	46,99		0	0
DF	23/05/2006			3	540	53,20		24000	3500
DF	30/05/2006	22/05/2006	11/06/2006	6,5	500	47,99		0	0
DF	06/11/2006	25/10/2006	18/11/2006	5	464	47,34		230	0
DF	20/03/2006	16/03/2006	04/04/2006	3	500	60,00		70	0
DF	30/10/2007	28/10/2007	28/11/2007	6	470	48,00		0	0
DF	25/09/2007	20/09/2007	14/10/2007	4	544	40,11		0	0
DF	25/09/2007			4	478	55,00		0	0
DF	14/09/2007	01/09/2007	17/11/2007	8	540	42,70		90	0
DF	14/08/2007	06/08/2007	06/09/2007	8	520	55,00		0	0
DF	10/11/2008	30/10/2008	14/12/2008		400	46,00		0	0
DF	04/11/2008	28/10/2008		5	500	54,90		0	0
DF	10/11/2008	02/11/2008	27/11/2008		502	48,99		900	0
DF	25/03/2008	19/03/2008	18/04/2008	5	574	53,24		0	0
DF	24/03/2008	12/03/2008	16/04/2008	5	524	54,85		2300	0
DF	24/03/2008	16/03/2008	29/03/2008	5	450	48,82		24000	0
DF	03/06/2008	01/05/2008	01/07/2008	4,5	500	69,76		93	0
DF	01/07/2008	19/06/2008	09/07/2008	8	485	40,77		0	0
DF	23/10/2001			5	506	52,62		23	0
DF	18/09/2001	17/09/2001	07/10/2001		506	55,00			0
DF	23/05/2001			8	500	55,00			0
DF	15/05/2001	09/05/2001	09/06/2001	8	500	51,38			0

UF	Data da coleta	Fabricação	Vencimento	T(°)	Peso (g)	Umidade %	%NaCl*	CTT**(NMP/g)	SCP (UFC/g)***
DF	20/06/2001	05/06/2001	05/07/2001	8	506	54,28			0
DF	10/01/2001	09/01/2001	07/02/2001		506	53,69			100
DF	21/02/2001	20/02/2001	20/03/2001	15	506	54,48			1000
DF	30/01/2001	29/01/2001	28/02/2001	5	506	52,91			0
DF	10/04/2001	08/04/2001	08/05/2001	5	506	52,53			0
DF	14/03/2001	13/03/2001	28/03/2001		506	54,90			0
DF	24/04/2001			-10	506	55,00			7300
DF	16/04/2001	10/04/2001		10	500	55,00			0
DF	03/04/2001	26/03/2001	19/04/2001	7	500	55,00			0
DF	07/12/2002			15	506	55,00		0	0
DF	07/12/2002			15	506	55,00		0	0
DF	07/12/2002			15	506	55,00		0	0
DF	13/04/2010	09/04/2010	04/05/2010		506	50,19		0	0
DF	14/04/2010	30/03/2010			506	48,53		0	0
DF	26/04/2010	27/04/2010	27/05/2010		506	47,90		0	0
DF	27/04/2010	23/04/2010	23/05/2010		506	52,09		0	0
DF	27/04/2010	07/04/2010	02/05/2010		506	48,02		0,23	0
DF	03/05/2010	02/05/2010	15/05/2010		506	45,82		0	0
DF	26/05/2010	25/05/2010	25/06/2010	5	506	51,63		2400	0
DF	21/06/2010	10/06/2010	10/07/2010	5	506	54,00		24000	0
DF	28/07/2010	20/07/2010	08/08/2010	6	506	63,00		2400	0
DF	10/08/2010	08/08/2010	31/08/2010	5	506	54,00		0	0
DF	17/08/2010	14/07/2010	28/07/2010		506	49,50		0	0
DF	17/08/2010	12/08/2010	17/09/2010		506	52,57		0	0
DF	18/08/2010	07/08/2010	27/08/2010		506	54,50		2300	0
DF	28/04/2010	23/04/2010		4	506	45,82		0	0
DF	27/09/2010	22/09/2010	14/10/2010	4	506	53,58		0	0
DF	29/09/2010	17/09/2010		6	506	42,73		0	0

UF	Data da coleta	Fabricação	Vencimento	T(°)	Peso (g)	Umidade %	%NaCl*	CTT**(NMP/g)	SCP (UFC/g)***
DF	25/10/2010	24/10/2010		7	506	52,86		93	0
DF	03/05/2010	24/04/2010	24/05/2010	7	400	35,85		24000	0
DF	30/08/2010	23/08/2010	23/09/2010	7	400	47,96		24000	2500000
DF	22/11/2010	22/11/2010		8	506	54,46		9	0
DF	10/05/2010			5	500	54,50		0	0
DF	06/10/2009	02/10/2009	31/10/2009		337	53,29		0	67000
DF	22/07/2003	15/07/2003	28/08/2003	15	460	50,10		0	0
DF	23/10/2001	23/10/2001	11/11/2001	5	506	54,90		0	0
DF	03/06/2002	23/05/2002	14/06/2002	8	500	55,00		240	120000
DF	20/12/2005	17/12/2005	17/02/2006	8	500	55,00			3200000
DF	07/12/2002			15	506	55,00		0	0
DF	20/12/2002			15	506	55,00		24000	0
DF	20/12/2002			15	506	55,00		24000	0
DF	25/10/2010	25/10/2010		7	506	47,46		23	0
DF	25/10/2010	25/10/2010		7	506	52,86		23	0
DF	26/10/2010	25/10/2010	03/10/2010	7	506	52,86		93	0
DF	12/06/2012	09/06/2012		5,5	246	55,00		11000	0
DF	22/05/2012	11/04/2012		6	478	55,00		0	0
DF	25/10/2010	25/10/2010		7	506	47,46		23	0
DF	18/06/2012	06/06/2012	01/07/2012	8		55,00		≥11000	<100
DF	03/07/2012	14/06/2012		7,6		55,00		≥11000	<100
DF	26/06/2012	22/05/2012		5,5		55,00		≥11000	<100
MS						55,00		>1,1x10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		>1,1x10 <sup>3</sup>	Ausência
MS		29/02/2012				55,00		> 1,1x10 <sup>3</sup>	Ausência
MS		08/03/2012	28/03/2012			55,00		4,3x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>5</sup>
MS		12/03/2012	12/04/2012			55,00		> 1,1x10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		> 1,1x10 <sup>3</sup>	Ausência

UF	Data da coleta	Fabricação	Vencimento	T(°)	Peso (g)	Umidade %	%NaCl*	CTT**(NMP/g)	SCP (UFC/g)***
RJ		10/05/2012	10/06/2012			55,00		<3,0	< 3,0
RJ		11/05/2012	05/06/2012			55,00			< 3,0
RJ		25/05/2012	24/06/2012			55,00		<3,0	< 3,0
RJ		25/05/2012	24/06/2012			55,00		<3,0	< 3,0
RJ		01/2012	02/2012			55,00			<10
ES	15/01/2010					55,00		>1100	30000
GO		23/03/2010	06/05/2012			55,00		1,1x10 <sup>5</sup>	<10
GO		29/07/2010	26/10/2010			55,00			400000
GO		NA	NA			55,00			1,2x10 <sup>8</sup>
GO	22/02/2011	16/02/2011	28/03/2011			55,00		>1,1x10 <sup>3</sup>	<10
GO	16/03/2011					55,00		1,1x10 <sup>6</sup>	4x10 <sup>9</sup>
GO	26/09/2011	19/09/2011	19/10/2011			55,00		> 1,1x10 <sup>3</sup>	<10
GO	26/09/2011	19/09/2011	19/11/2011			55,00		> 1,1x10 <sup>3</sup>	<10
GO	26/09/2011	07/09/2011				55,00		> 1,1x10 <sup>3</sup>	<10
GO	29/08/2011	17/08/2011	17/09/2011			55,00		> 1,1x10 <sup>3</sup>	<10
GO	29/08/2011	16/08/2011				55,00		> 1,1x10 <sup>3</sup>	<10
GO	26/09/2011	17/09/2011	31/10/2011			55,00		> 1,1x10 <sup>3</sup>	<10
GO	28/11/2011	20/11/2011	15/12/2011			55,00		> 1,1x10 <sup>3</sup>	<10
GO	28/11/2011	16/11/2011	26/12/2011			55,00		9,3x10	<10
GO	28/11/2011	26/10/2011				55,00		>1,1x10 <sup>3</sup>	<10
GO	28/11/2011	23/10/2011				55,00		>1,1x10 <sup>3</sup>	<10
GO	28/11/2011	24/10/2011	07/12/2011			55,00		<3	<10
GO	28/11/2011	15/11/2011	05/12/2011			55,00		>1,1x10 <sup>3</sup>	<10
GO	05/12/2011	16/11/2011	30/12/2011			55,00		>1,1x10 <sup>3</sup>	<10
GO	05/12/2011	12/11/2011	12/01/2012			55,00		>1,1x10 <sup>3</sup>	<10
MA	29/03/2011	27/03/2011	06/04/2011			55,10		0	0
MA	21/06/2011	20/06/2011	20/08/2011			52,73		0	0
MG	27/04/2010	22/04/2010	06/05/2010			58,31			120000

UF	Data da coleta	Fabricação	Vencimento	T(°)	Peso (g)	Umidade %	%NaCl*	CTT**(NMP/g)	SCP (UFC/g)***
MG	13/04/2010	18/03/2010	18/04/2010			54,08	0,64		<100
MG	13/04/2010	11/04/2010	26/04/2010			65,77	1,23		<100
MG	14/04/2010	10/04/2010				66,56	1,11		<100
MG	05/05/2010	28/04/2010	19/05/2010			60,72	2,46		<100
MG	18/05/2010	11/05/2010				57,26	1,52		<100
MG	15/06/2010	03/06/2010	30/06/2010			58,47	1,29		<100
MG	23/06/2010	15/06/2010	15/07/2010			59,98	0,92		<100
MG	06/07/2010	30/05/2010	30/07/2010			72,17	1,44		<100
MG	06/07/2010	03/07/2010	18/07/2010			58,48	1,06		<100
MG	07/07/2010	15/06/2010	15/07/2010			58,09	1,20		<100
MG	12/07/2010	10/07/2010	20/07/2010			65,17	1,56		<100
MG						50,82	1,64		<100
MG						63,50	1,33		<100
MG						57,36	1,49		<100
MG						54,10	1,05		<100
MG						56,84	0,79		<100
MG						63,01	0,90		<100
MG						62,51	1,11		<100
MG						64,25	0,75		<100
MG						55,00			>10^5
MG						55,00			600000
MG						55,00			41000
MG						55,00			9000
MG						55,00			18000
MG						55,00			2800
MG						40,68	0,74		<100
MG	03/05/2011	30/04/2011	14/05/2011			64,62	1,55		<100
MG	08/05/2011	08/05/2011	07/06/2011			59,16	1,04		25600

UF	Data da coleta	Fabricação	Vencimento	T(°)	Peso (g)	Umidade %	%NaCl*	CTT**(NMP/g)	SCP (UFC/g)***
MG	16/05/2011	29/04/2011	28/05/2011			59,71	1,14		<100
MG	23/05/2011	25/04/2011	25/05/2011			59,71	0,94		<100
MG	31/05/2011	27/05/2011				62,52	0,66		<100
MG	08/06/2011	01/05/2011	01/07/2011			67,13	1,25		<100
MG	16/08/2011	14/08/2011				62,12	1,27		<100
MG	09/08/2011					55,00			1,8E+08
MG	04/07/2011	18/06/2011	17/07/2011			57,09	1,11		<100
MG	04/07/2011	16/06/2011				62,08	1,14		<100
MG	06/09/2011	25/08/2011	25/09/2011			58,02	1,36		<100
MG	27/09/2011	24/09/2011	04/10/2011			65,70	1,09		<100
MS	12/09/2011	15/08/2011	30/09/2011			74,69	0,67		33000
MG	26/09/2011	03/09/2011	02/10/2011			71,16	1,54		<100
MG						46,16	2,02		<100
MG						51,93	1,03		440000
MG						61,10	0,73		<100
MG						53,05	4,63		19000000
MG						58,70	1,23		<100
MG						59,65	0,92		900
MS						55,00		>1,1x10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		Ausência	Ausência
MS						55,00		4	Ausência
MS						55,00		4	Ausência
MS						55,00		4	Ausência
MS						55,00		>1,1x10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		>1,1x10 <sup>4</sup>	Ausência
MS						55,00		> 1,1x10 <sup>4</sup>	23000000
MS						55,00		9,3x10 <sup>2</sup>	3,7x10 <sup>9</sup>
MS						55,00		>1,1 x 10 <sup>4</sup>	Ausência

UF	Data da coleta	Fabricação	Vencimento	T(°)	Peso (g)	Umidade %	%NaCl*	CTT**(NMP/g)	SCP (UFC/g)***
MS						55,00		2,3x10 <sup>2</sup>	Ausência
MS						55,00		2,3 x 10 <sup>2</sup>	Ausência
MS						55,00		>1,1x10 <sup>4</sup>	Ausência
MS						55,00		>1,1x 10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		4,6 x 10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		9	Ausência
MS						55,00		Ausência	Ausência
MS						55,00		9	12000000
MS						55,00		Ausência	Ausência
MS						55,00		Ausência	Ausência
MS						55,00		Ausência	Ausência
MS						55,00		>1,1 x 10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		>1,1 x 10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		>1,1 x 10 <sup>3</sup>	100000
MS						55,00		>1,1 x 10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		Ausência	Ausência
MS						55,00		>1,1 x 10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		>1,1 x 10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		4	Ausência
MS						55,00		1,1x10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		>1,1 x 10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		Ausência	Ausência
MS						55,00		>1,1 x 10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		>1,1 x 10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		>1,1 x 10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		>1,1 x 10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		2,4x10	Ausência
MS						55,00		Ausência	Ausência

UF	Data da coleta	Fabricação	Vencimento	T(°)	Peso (g)	Umidade %	%NaCl*	CTT**(NMP/g)	SCP (UFC/g)***
MS						55,00		>1,1 x 10 <sup>3</sup>	Ausência
MS						55,00		4	Ausência
MS						55,00		4	Ausência
MS						55,00		4	Ausência
MS						55,00		>1,1x10 <sup>3</sup>	Ausência
PR						55,00		1,1x10 <sup>3</sup>	2,5x10
RJ						55,00		< 10	< 10
RJ						55,00		< 10	< 10
RJ						55,00		< 10	< 10
RJ						55,00		< 10	< 10
RJ						55,00		< 3,0	< 10
RJ						55,00		< 3,0	< 10
RJ						55,00		< 3,0	< 10
RJ						55,00		2,8x10	< 10
RJ						55,00		< 3,0	< 10
RJ						55,00		< 3,0	< 10
RJ						55,00		< 3,0	< 10
RJ						55,00		< 3,0	< 10
RJ						55,00		< 3,0	< 10
RJ		17/06/2011	17/07/2011			55,00		<0,3	<10
RJ		15/07/2011	08/08/2011			55,00		<0,3	<10
RJ		03/08/2011	05/09/2011			55,00		<0,3	<10
RJ		01/04/2011	15/04/2011			55,00		<0,3	<10
RJ		02/04/2011	26/04/2011			55,00		<0,3	<10
RJ		24/04/2011	24/05/2011			55,00		<0,3	<10
RJ		21/04/2011	21/05/2011			55,00		<0,3	<10
RJ		28/04/2011	31/05/2011			55,00		<3,0	<10
RJ		06/11/2011	06/07/2011			55,00		2,4x10	<10
RJ		06/11/2011	07/11/2011			55,00		2,4x10	<10

UF	Data da coleta	Fabricação	Vencimento	T(°)	Peso (g)	Umidade %	%NaCl*	CTT**(NMP/g)	SCP (UFC/g)**
RJ		24/04/2011	24/05/2011			55,00		2,4x10	<10
RJ						55,00		4,3x10	<10
SC						55,00		< 3	<100
SC						55,00		< 3	<100

\* analisado \*\*coliformes termotolerantes \*\*\* *Staphylococcus*coagulase positiva - Estados RJ e GO reportaram >10 NMP/g